ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΤΟΥ Γ.Π.Α.

ΚΛΑΔΟΣ VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Sideritis L. (S. scardica, S. perfoliata, S. raeseri)

ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΙΧΑΗΛ Ι. ΓΑΚΗΣ

AOHNA, 2016

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΤΟΥ Γ.Π.Α.

ΚΛΑΔΟΣ VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Sideritis L. (S. scardica, S. perfoliata, S. raeseri)

ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΙΧΑΗΛ Ι. ΓΑΚΗΣ

AOHNA, 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ TOY ΓΕΝΟΥΣ Sideritis L. (S. scardica, S. perfoliata, S. raeseri)

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΙΧΑΗΛ Ι. ΓΑΚΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων: Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη: Παππάς Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής

Τρίγκας Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο σύνολό της στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Πέτρο Ταραντίλη, για την ανάθεση του θέματος, την εποικοδομητική καθοδήγησή του και την άριστη συνεργασία, καθώς και για τη συνεχή του στήριξη και το καθημερινό του ενδιαφέρον κατά τη διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τις ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω, επίσης, στον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου, κατά την εκπόνηση της μελέτης, κ. Μόσχο Πολυσίου για τη δυνατότητα υλοποίησης της παρούσας μελέτης στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, ενθαρρύνοντας με να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματός μας.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά για τη συνεχή του στήριξη, την προθυμία του να βοηθήσει, καθώς και για τη συμβολή του με καθοριστικές, ακέραιες και αυστηρές παρεμβάσεις όταν ήταν απαραίτητο.

Πολλές ευχαριστίες, επίσης, στον κ. Παναγιώτη Τρίγκα, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Συστηματικής Βοτανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη διαφωτιστική του συμμετοχή και το αμέριστο ενδιαφέρον του για την ολοκλήρωση της μελέτης μου.

Τις πλέον θερμές μου ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην υποψήφια διδάκτορα, επιβλέπουσα και φίλη μου Χριστίνα Μήτση για την αποτελεσματικότατη καθοδήγησή της στο κομμάτι των εργαστηριακών αναλύσεων, χωρίς την οποία η παρούσα εργασία δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Ένα ΜΕΓΑΛΟ μέρος το οφείλω σε αυτήν! Ευχαριστώ, επιπλέον, για τη βοήθειά του τον κ. Θανάση Κυμπάρη, Επίκουρο Καθηγητή του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και συνεργάτη του Εργαστηρίου Χημείας, του οποίου οι παρεμβάσεις αποτέλεσαν πολύτιμο λίθο στην ολοκλήρωση του οικοδομήματος αυτού.

Ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο, θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό που είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με ικανούς επιστήμονες και κυρίως εξαιρετικούς ανθρώπους. Σας ευχαριστώ για όσα γνωρίζετε και προσφερθήκατε να μου μάθετε, μα περισσότερο σας ευχαριστώ για την ποιότητα του χαρακτήρα σας και την ευκαιρία που μου δώσατε να σας γνωρίσω.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους και συνεργάτες μου, πολλούς από τους οποίους απέκτησα εντός του εργαστηρίου αυτού, για την ολόπλευρη στήριξη, υπομονή τους, καθώς και για τη συμβολή τους στη διαμόρφωση αυτού του τόσο φιλικού και οικογενειακού κλίματος στους χώρους του εργαστηρίου.

Γάκης Κωνσταντίνος-Μιχαήλ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2016

Περίληψη

Συγκριτική μελέτη των χημικών συστατικών φυτικών ειδών του γένους Sideritis L. (S. scardica, S. perfoliata, S. raeseri)

Κωνσταντίνος Μιχαήλ Ι. Γάκης

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την ανάλυση και τη συγκριτική μελέτη του χημικού προφίλ (αιθέριο έλαιο, υδρομεθανολικά εκχυλίσματα) των Sideritis scardica, Sideritis perfoliata και Sideritis raeseri. Παράλληλα, επιχειρήθηκε να διαπιστωθεί εάν η φαινοτυπική παραλλακτικότητα μεταξύ δύο εξεταζόμενων δειγμάτων Sideritis perfoliata (A και B) συνδυάζεται με διακριτό χημικό προφίλ.

Στο πλαίσιο αυτό, το αιθέριο έλαιο από τη δρόγη των πληθυσμών αυτών παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη και αναλύθηκε με χρήση τεχνικών GC-MS. Για τη μελέτη των μη πτητικών συστατικών, φυτικά εκχυλίσματα (USAE, MeOH : H2O 70 : 30) αναλύθηκαν με χρήση τεχνικών HPLC-DAD και LC-MS. Παράλληλα, οι εξεταζόμενοι πληθυσμοί μελετήθηκαν συγκριτικά αξιοποιώντας την υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (DRIFTS, ATR), ενώ για την περαιτέρω ανάλυση των πειραματικών δεδομένων εφαρμόστηκαν μέθοδοι πολυμεταβλητής χημειομετρικής ανάλυσης (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών, Ανάλυση Συστάδων).

Σε ότι αφορά στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο, το σύνολο των πληθυσμών παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλές τιμές, με τα Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B, ωστόσο, να εμφανίζουν σχεδόν διπλάσιες αποδόσεις από τα Sideritis scardica και Sideritis raeseri.

Σχετικά με τη σύσταση του αιθερίου ελαίου, στο Sideritis perfoliata Α κυριαρχούν οι μονοτερπενικοί και σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες, με κυρίαρχα συστατικά το *α*-πινένιο, το *cis*-καλαμενένιο και το *γ*-γουργουνένιο. Αντίθετα, στον πληθυσμό Sideritis perfoliata Β κυριαρχούν τα μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια (*Z*καρυοφυλλένιο, *cis*-καλαμενένιο, δικυκλογερμακρένιο). Τα μη οξυγονούχα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια παρουσιάστηκαν ως κυρίαρχα συστατικά στο αιθέριο έλαιο του Sideritis raeseri (*Z*-καρυοφυλλένιο, δικυκλογερμακρένιο, *α*- και *β*πινένιο). Το αιθέριο έλαιο του Sideritis scardica παρουσίασε διακριτή εικόνα από τους υπόλοιπους τρεις πληθυσμούς, με κυρίαρχα συστατικά το 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο και το δεκανοϊκό οξύ και χαμηλά ποσοστά μονο- και σεσκιτερπένιων.

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών βρέθηκαν να περιέχουν, μεταξύ άλλων, παράγωγα υδροκιναμικού οξέος, γλυκοζίτες φαινυλαιθανοειδών, καθώς και γλυκοζίτες και ακετυλογλυκοζίτες φλαβονοειδών. Στο Sideritis perfoliata A, όπως και στο Sideritis raeseri, κύριο συστατικό ήταν ο 7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης, ακολουθούμενος από το βερμπασκοζίτη. Στο Sideritis perfoliata B κυριαρχούν ο 7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της 4΄-Ο-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης, ακολουθούμενος από τις δύο ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο Sideritis perfoliata A. Οι δύο αυτές ενώσεις είναι κυρίαρχες και στο εκχύλισμα του Sideritis scardica, από κοινού με τον 7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2)-[6"-Ο-ακετυλο]-γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης.

Σε ότι αφορά στη συγκριτική φασματοσκοπική μελέτη των πληθυσμών βάσει της υπέρυθρης φασματοσκοπίας, δεν ήταν επιτυχής η διάκριση μεταξύ τους βάσει των φασμάτων DRIFTS τόσο του αρχικού φυτικού υλικού, όσο και αυτού μετά την υδροαπόσταξη. Ομοίως, μη ικανοποιητικός κρίνεται ο διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών βάσει των φασμάτων ATR των μη υδρολυμένων και υδρολυμένων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τους. Αντίθετα, αναδεικνύεται ότι η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων ATR των υδροαπόσταξη του φυτικού υλικού μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διάκριση των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Από τη χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν στα συστατικά του αιθερίου ελαίου, αναδεικνύεται ότι ορισμένα από τα συστατικά ενδέχεται να μπορούν να αξιοποιηθούν ως χημειοταξινομικοί δείκτες (π.χ. Ζ-καρυοφυλλένιο, δεκατετρανάλη, *n*-δεκαπεντανόλη, *E*,*E*-λιναλοολικό γερανύλιο, 2-δεκαπεντανόνη, δεκαεξανόλη, *E*,*Z*-λιναλοολικό γερανύλιο, λινελαϊκός μεθυλεστέρας, νεο-αμπιετόλη, κ.ά.).

Σε ότι αφορά στη χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, αναδεικνύεται ότι οι συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των φασμάτων ATR ερμηνεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας, υπογραμμίζοντας τη δυναμική της υπέρυθρης φασματοσκοπίας ως χημειοταξινομικού εργαλείου.

Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης συστάδων τόσο βάσει του προφίλ του αιθερίου ελαίου, όσο και αυτού των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων αναδεικνύουν την απόκλιση των δύο πληθυσμών *Sideritis perfoliata* A και *Sideritis perfoliata* B, διαφοροποίηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση για τις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών πληθυσμών και ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για διαφορετικά υποείδη.

Abstract

Comparative study of the chemical components of plant species in the genus *Sideritis* L. (*S. scardica, S. perfoliata, S. raeseri*)

Konstantinos Michail I. Gakis

The present study aimed at the elucidation and comparison of the chemical profiles (essential oil, hydromethanolic extracts) of *Sideritis scardica, Sideritis perfoliata* and *Sideritis raeseri*. Furthermore, it attempted to investigate whether the observed phenotypic variance between two *Sideritis perfoliata* populations was combined with distinct chemical profiles.

The essential oils from the examined populations were acquired through hydrodistillation and analyzed by means of GC-MS. The study of the non-volatile components was based at the analysis of plant extracts (USAE, MeOH : H2O 70 : 30) using HPLC-DAD and LC-MS. Moreover, the examined plant material was analyzed by means of Fourier- transform IR spectroscopy (DRIFTS, ATR), while multivariate chemometrics (Principal Component Analysis, Cluster Analysis) were also applied.

Regarding the essential oil, rather small yields were observed for all the population, but *Sideritis perfoliata* A and *Sideritis perfoliata* B presented yielded almost twice as much essential oil as *Sideritis scardica* and *Sideritis raeseri*.

Regarding the essential oil composition, *Sideritis perfoliata* A mainly contains monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons, e.g. α -pinene, *cis*-calamenene and γ gurjunene. On the contrary, *Sideritis perfoliata* B mainly constists of non-oxygenated sesquiterpenes (Z-caryophyllene, *cis*-calamenene, bicyclogermacrene). Nonoxygenated monoterpenes and sesquiterpenes were found to be the main components of the essential oil of *Sideritis raeseri* (Z-caryophyllene, bycyclogermqacrene, α - and β -pinene). The essential oil of *Sideritis scardica* presented a distinct profile, having 2E-dodecenyl acetate and decanoic acid as main components and very low percentages of mono- and sesquiterpenes.

The hydromethanolic extracts contained, among others, hydroxycinnamic acid derivatives, phenylethanoid glycosides and flavonoid glycosides and acetylglycosides. Isoscutellarein 7-O-[6'''-0-acetyl]-allosyl ($1 \rightarrow 2$) glucoside was the main component of both *Sideritis perfoliata* A and *Sideritis raeseri* extracts, along with verbascoside. These two components were present in high percentages in both the extracts of *Sideritis perfoliata* B [along with 4'-O-methylisoscutellarein 7-0-[6'''-0-acetyl]-

allosyl $(1\rightarrow 2)$ glucoside] and that of *Sideritis scardica* [along with isoscutellarein 7-O-[6'''-0-acetyl]-allosyl $(1\rightarrow 2)$ -[6''-O-acetyl]- glucoside].

As for the spectroscopic study of the populations which is based on the infrared spectroscopy, a successful discrimination among them wasn't achieved neither based on the pre-hydrodistillation DRIFT spectra nor on the after-hydrodistillation spectrums. The discrimination based on ATR spectra of the non-hydrolyzed and the hydrolyzed hydromethanolic extracts was also not satisfactory. However, a robust discrimination of the populations was achieved when comparing the ATR spectra of the hydrodistillation aqueous extracts.

The chemometric analysis of the volatile compounds revealed the potential of various compounds that could be used as chemotaxonomic indicators (*Z*-caryophyllene, tetradecanal, *n*-pentadecanol, *E*,*E*-geranyl linalool, 2- pentadecanone, decanoic acid, kaur-15-ene, manool oxide, 2*E*-dodecenyl acetate, *n*-hexadecanol, *E*,*Z*-geranyl linalool, methyl linoleate, *neo*-abietol, etc.)

According to the chemometric analysis of the hydromethanolic extracts, the correlation match value among the ATR spectra is able to interpret most of the observed variance, highlighting the potential of infrared spectroscopy as a chemotaxonomic tool.

Lastly, cluster analysis of both essential oil and hydromethannolic extracts' data brings forward the variability between the *Sideritis perfoliata* A and *Sideritis perfoliata* B populations. This comes in agreement with the observed morphological differences between these two populations, further supporting the hypothesis of them belonging to distinct subspecies.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περίληψη	7
Abstract	9
Κατάλογος Πινάκων	. 13
Κατάλογος Γραφημάτων	. 15
Κατάλογος Γραφημάτων Παραρτήματος	. 16
Κατάλογος Εικόνων	. 18
Κατάλογος Συντμήσεων	. 19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	. 20
1.1 Βοτανική ταξινόμηση	. 20
1.1.1 Τα είδη του γένους <i>Sideritis</i> L. στην Ελλάδα	. 20
1.2 Σύντομη περιγραφή των κυριότερων ελληνικών ειδών σιδερίτη	. 22
1.3 Στοιχεία της καλλιέργειας του σιδερίτη και καλλιεργητικές τεχνικές	. 22
1.4 Χημικό προφίλ	. 24
1.4.1. Αιθέριο έλαιο - πτητικές ουσίες	. 24
1.4.1.1. Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση των συστατικών του αιθερίου	
ελαίου	. 24
1.4.1.2 Απόδοση σε αιθέριο έλαιο	. 27
1.4.1.3. Σύσταση αιθερίου ελαίου	. 28
1.4.1.4 Χημειοταξινόμηση βάσει του αιθερίου ελαίου	. 33
1.4.2 Διτερπένια του σιδερίτη	. 33
1.4.2.1 Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση διτερπενίων	. 33
1.4.2.2 Διτερπένια των κυριότερων ελληνικών ειδών σιδερίτη	. 34
1.4.2.3 Χημειοταξινόμηση βάσει των διτερπενίων	. 35
1.4.3 Φλαβονοειδή του σιδερίτη	. 39
1.4.3.1. Σύνθεση φλαβονοειδών	. 40
1.4.3.2.Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση των φλαβονοειδών	. 41
1.4.3.3.Ανάλυση των φλαβονοειδών των φυτών του γένους Sideritis L	. 42
1.4.3.4. Χημειοταξινόμηση βάσει των φλαβονοειδών	. 44
1.5 Βιολογική δράση του σιδερίτη	. 44
1.5.1. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων	. 51
1.5.2. Αντιφλεγμονώδης δράση	. 53
1.5.3 Αντιελκογόνος δράση	. 54
1.5.4 Δράση ως εκλεκτικοί τροποποιητές οιστρογονικών υποδοχέων	. 54

1.6 Σκοπός της εργασίας	
2. Πειραματικό μέρος	57
2.1 Φυτικό υλικό	57
2.2 Παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών αιθερίου ελαίου	58
2.3 Παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος που προ μέσω της υδροαποστάξης	έκυψε 60
2.4 Συγκριτική μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους	62
2.5 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-	IR 65
2.6 Χημειομετρική επεξεργασία πειραματικών δεδομένων	67
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση	68
3.1 Συγκριτική μελέτη του αιθερίου ελαίου	68
3.1.1 Απόδοση σε αιθέριο έλαιο	68
3.1.2 Σύσταση του αιθερίου ελαίου	69
3.2 Συγκριτική μελέτη υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	
3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR.	
3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	79 `-IR – 79
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR 	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR 3.3.2.1 Υδατικά εκχυλίσματα μετά την υδροαπόσταξη 	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη 3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος ATR	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	
 3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. 3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη	

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2 Συγκέντρωση (% του συνόλου του αιθερίου ελαίου) των διάφορων ομάδων
συστατικών στο αιθέριο έλαιο Sideritis scardica που παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη και με
εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO ₂ [τροποποίηση απόTadić et al. (2012)]
Πίνακας 3 Διτερπενοειδείς ενώσεις από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που απαντώνται στην
Ελλάδα
Πίνακας 4 Φλαβονοειδή των κυριότερων ειδών σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα 43
Πίνακας 5 Φαρμακολογικές δράσεις και παραδοσιακές χρήσεις ειδών του γένους Sideritis
(τροποποίηση από Gonzáles-Burgos et al., 2011)
Πίνακας 6 Αντιμικροβιακή δράση (MIC σε mg/mL) των αιθερίων ελαίων ειδών σιδερίτη και
των κύριων συστατικών τους (τροποποίηση από Aligiannis et al., 2001)
Πίνακας 7 Σύσταση (%) των αιθερίων ελαίων των αναλυθέντων δειγμάτων σιδερίτη και
χρόνοι έκλουσης (t _R) των συστατικών70
Πίνακας 8 Συστατικά των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων πληθυσμών
σιδερίτη που ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων
Πίνακας 9 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%) των φασμάτων
FT-IR του αρχικού φυτικού υλικού των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη
Πίνακας 10 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%) των φασμάτων
FT-IR του φυτικού υλικού μετά την υδροαπόσταξη των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη 84
Πίνακας 11 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%)των μέσων
φασμάτων FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος μετά την υδροαπόσταξη των τεσσάρων
πληθυσμών σιδερίτη
Πίνακας 12 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%)των φασμάτων
FT-IR του αρχικού υδρομεθανολικού εκχυλίσματος των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη 92
Πίνακας 13 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%) των φασμάτων
FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος μετά από όξινη υδρόλυση των τεσσάρων
πληθυσμών σιδερίτη
Πίνακας 14 Αριθμός κύριων συνιστωσών για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου
ακολουθούμενος από την αντίστοιχη ιδιοτιμή, το ποσοστό παραλλακτικότητας που
αποδίδεται σε κάθε παράγοντα και την αθροιστική παραλλακτικότητα που ερμηνεύει κάθε
σύνολο παραγόντων
Πίνακας 15 Αποτελέσματα της περιστροφής varimax για κάθε συστατικό του αιθερίου
ελαίου και κάθε μία από τις 3 κύριες συνιστώσες που καθορίστηκαν. Παρουσιάζονται μόνο
τα δεδομένα για τις μεταβλητές που κατανεμήθηκαν σε κάποια κύρια συνιστώσα
Πίνακας 16 Αριθμός κύριων συνιστωσών για τα συστατικά των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων ακολουθούμενος από την αντίστοιχη ιδιοτιμή, το ποσοστό παραλλακτικότητας
που αποδίδεται σε κάθε παράγοντα και την αθροιστική παραλλακτικότητα που ερμηνεύει
κάθε σύνολο παραγόντων
Πίνακας 15 Αποτελέσματα της περιστροφής varimax για κάθε συστατικό του αιθερίου
ελαίου και κάθε μία από τις 3 κύριες συνιστώσες που καθορίστηκαν. Παρουσιάζονται μόνο
τα δεδομένα για τις μεταβλητές που κατανεμήθηκαν σε κάποια κύρια συνιστώσα 100

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1 Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των ειδών του γένους Sideritis L. (μπλε)
σε υπογένη (κόκκινο) και ομάδες (πράσινο)
Γράφημα 2 Ομάδες συστατικών του αιθερίου ελαίου S. raeseri subsp. raeseri σε τέσσερα
στάδια ανάπτυξης (Pljevljakušić et al., 2011)
Γράφημα 3 Δομές των διτερπενοειδών ενώσεων από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που
απαντώνται στην Ελλάδα
Γράφημα 4 Σύστημα C_6 - C_3 - C_6
Γράφημα 5 Φαινολικός δακτύλιος
Γράφημα 6 Δομές της λινεαρόλης, της σιδερόλης και της επικανδικανδιόλης53
Γράφημα 7 Απόδοση (mL/100g ξερού φυτικού υλικού) σε αιθέριο έλαιο
Γράφημα 8 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
perfoliata A74
Γράφημα 9 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
perfoliata B75
Γράφημα 10 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
scardica75
Γράφημα 11 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
raeseri
Γράφημα 11 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του Sideritis perfoliata Α πριν (μπλε
φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη
Γράφημα 12 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του Sideritis perfoliata Β πριν (μπλε φάσμα)
και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη
Γράφημα 13 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του Sideritis scardica πριν (μπλε φάσμα)
και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη
Γράφημα 14 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του Sideritis raeseri πριν (μπλε φάσμα) και
μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη
Γράφημα 15 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την
υδροαπόσταξη του Sideritis perfoliata A
Γράφημα 16 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την
υδροαπόσταξη του Sideritis perfoliata B
Γράφημα 17 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την
υδροαπόσταξη του Sideritis scardica
Γράφημα 18 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την
υδροαπόσταξη του Sideritis raeseri
Γράφημα 19 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
perfoliata Α πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση
Γράφημα 20 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
perfoliata B πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση90
Γράφημα 21 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
scardica πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση
Γράφημα 23 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis
raeseri πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση

Γράφημα 24 Απεικόνιση του αριθμού κυρίων συνιστωσών και της αντίστοιχης ιδιοτιμής για
τα συστατικά του αιθερίου ελαίου95
Γράφημα 25 Απεικόνιση του αριθμού κυρίων συνιστωσών και της αντίστοιχης ιδιοτιμής για
τα συστατικά του αιθερίου ελαίου
Γράφημα 24 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Ward
βάσει των συστατικών του αιθερίου ελαίου. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης 102
Γράφημα 25 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Centroid
βάσει των συστατικών του αιθερίου ελαίου. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης 102

Κατάλογος Γραφημάτων Παραρτήματος

Γράφημα Π 1 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata A
Γράφημα ΙΙ 2 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata B
Γράφημα Π 3 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis raeseri 119
Γράφημα Π 4 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis scardica.120
Γράφημα Π 5 Δομές των συστατικών των αιθερίων ελαίων των εξεταζόμενων πληθυσμών
σιδερίτη
Γράφημα Π 6 Δομές των συστατικών των αιθερίων ελαίων των εξεταζόμενων πληθυσμών
σιοεριτή (συνεχεια)
Γράφημα Π 7 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata A (κόκκινο), S. perfoliata B ($\mu\pi\lambda\epsilon$), S. raeseri
(πράσινο) και S.scardica (μαύρο)123
Γράφημα Π 8 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata A (κόκκινο), S. perfoliata B (μπλε), S. raeseri
(πράσινο) και S.scardica (μαύρο) μετά την όξινη υδρόλυση124
Γράφημα Π 9 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata Α πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση
(κόκκινο)
Γράφημα Π 10 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata Β πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση
(κόκκινο)
Γράφημα Π 11 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis raeseri πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο). 126
Γράφημα Π 12 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών
εκχυλισμάτων των Sideritis scardica πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο).

Γράφημα Π 13 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του βερμπασκοζίτη	127
Γράφημα Π 14 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του 7-Ο-[6'''-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1 \rightarrow 2)	
γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης	127
Γράφημα Π 15 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του 7-Ο-[6'''-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1 \rightarrow 2)	
γλυκοζίτη της 4΄-Ο-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης	128

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Η πειραματική διάταξη τύπου Clevenger που χρησιμοποιήθηκε για την
υδροαπόσταξη
Εικόνα 2 Το σύστημα GC - MS που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αιθερίων ελαίων.
Εικόνα 3 Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των υδατικών
εκχυλισμάτων61
Εικόνα 4 Η συσκευή του λουτρού υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των
υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων
Εικόνα 5 Ο περιστροφικός εξατμιστήρας (rotary evaporator) που χρησιμοποιήθηκε
Εικόνα 6 Το σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A 64
Εικόνα 7 Το όργανο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε για την κατταγραφή των φασμάτων 66

Κατάλογος Συντμήσεων

ATR	Attenuated Total Reflectance	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση			
CA	Cellulose Acetate	Οξική Κυτταρίνη			
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Μεταβαλλόμενου			
DAD	Diode Allay Detector	Μήκους Κύματος			
	Diffuse Reflectance Infra-Red	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία			
DRIFTS	Fourier Transform Spectroscopy	Διάχυτης Ανάκλασης με			
		Μετασχηματισμό Fourier			
ESI	Electron Spray Ionization	Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό			
FT-IR	Fourier Transform – Infrared	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με			
F I -IK	Spectroscopy	Μετασχηματισμό Fourier			
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία			
	High Performance Liquid	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής			
nfle	Chromatography	Απόδοσης			
нѕ	Head Space	Παραλαβή από το χώρο Πάνω από			
115	Tread Space	το Φυτό			
LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία			
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μαζών			
MSDF	Micro-Steam Distillation	Μικρο-Απόσταξη με Υδρατμούς -			
MBDE	Extraction	Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη			
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός			
	Nuclear Magnetic Resonance	Συντονισμός			
PTFE	PolyTetraFluoroEthylene	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο			
SPME	Solid Phase Micro-Extraction	Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης			
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας			
TISAF	UltraSound Assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από			
USAL	Onrasound Assisted Extraction	Υπέρηχους			
UV - Vis	UltraViolet - Visible	Υπεριώδες - Ορατό			

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βοτανική ταξινόμηση

1.1.1 Τα είδη του γένους Sideritis L. στην Ελλάδα

Το γένος Sideritis L. ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae (συν. Labiatae) και τη φυλή Lamieae (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011). Περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη, τα οποία ταξινομούνται σε δύο υπογένη (subgenera) και επτά ομάδες (sections), όπως παρουσιάζεται στο **Γράφημα 1**.



Γράφημα 1 Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των ειδών του γένους *Sideritis* L. (μπλε) σε υπογένη (κόκκινο) και ομάδες (πράσινο).

Η πλειονότητα (περίπου 125) των ειδών του γένους ανήκουν στο υπογένος Sideritis, ενώ το υπογένος Marrubiastrum περιλαμβάνει 24 πολυετή είδη, ενδημικά της Μαδέιρα και των Καναρίων Νήσων (Gonzáles-Burgos et al., 2011). Εντός του υπογένους Sideritis, η sect. Sideritis περιλαμβάνει πολυετή είδη της δυτικής Μεσογείου και η sect. Empedoclea πολυετή είδη της ανατολικής Μεσογείου, ενώ στις sect. Hesiodia και Burgsdorfia ανήκει μικρός αριθμός μονοετών ειδών της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας (Gonzáles-Burgos et al., 2011).

Η ταξονόμηση των ειδών του γένους Sideritis L. είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του υψηλού βαθμού πολυμορφισμού που εμφανίζουν, της παραλλακτικότητας μεταξύ των διαφορετικών οικότυπων του γένους και της έντονης τάσης υβριδισμού μεταξύ των ειδών. Προκειμένου να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, έχει προταθεί η χημειοταξινόμηση των ειδών του γένους με κριτήριο τους δευτερογενείς μεταβολίτες τους, όπως τα διτερπενοειδή και τα φλαβονοειδή (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011). Η σκοπιμότητα του χαρακτηρισμού βάσει του χημειότυπου ενισχύεται και από τις χρήσεις των ειδών του, οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από τη χημική σύσταση, παρά από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού.

Στην Ελλάδα εξαπλώνονται 11 είδη του γένους Sideritis (συνολικά 16 είδη και υποείδη), 8 (11) εκ των οποίων ανήκουν στην sect. Empedoclea (Dimopoulos et al. 2013), που περιλαμβάνει τα είδη που είναι γνωστά ως «τσάι του βουνού». Τα είδη του Sideritis sect. Empedoclea που εξαπλώνονται στην Ελλάδα είναι τα εξής:

- *S. raeseri*: Ενδημικό είδος του δυτικού τμήματος της Βαλκανικής Χερσονήσου. Στην Ελλάδα διακρίνονται δύο υποείδη:

S. raeseri subsp. raeseri: Εξαπλώνεται στα όρη της Βόρειας και Κεντρικής Ελλάδας, νότια μέχρι τα όρη της Στερεάς Ελλάδας. Είναι το μόνο που καλλιεργείται σε ευρεία εμπορική κλίμακα.

S. raeseri subsp. attica: Ενδημικό είδος των ορέων Πάρνηθα, Πατέρας και Κιθαιρώνας στην Αττική.

- *S. clandestina* (τσάι Ταϋγέτου). Ενδημικό είδος των βουνών της Πελοποννήσου. Διακρίνονται δύο υποείδη:

S. clandestina subsp. clandestina: Ενδημικό στα όρη της Νότιας Πελοποννήσου.

S. clandestina subsp. peloponnesiaca: Ενδημικό στα όρη της Βόρειας Πελοποννήσου και στο Μαίναλο.

 - S. scardica: (τσάι Ολύμπου). Ενδημικό είδος του νότιου τμήματος της Βαλκανικής Χερσονήσου. Στην Ελλάδα εξαπλώνεται στα όρη της Βόρειας Ελλάδας, εκτός από την οροσειρά της Πίνδου, καθώς και στη Θάσο.

- S. euboea: (τσάι Εύβοιας). Ενδημικό είδος στα βουνά της Εύβοιας.

- S. perfoliata: Είδος με εξάπλωση στα Βαλκάνια και την Ανατολική Μεσόγειο.
 Στην Ελλάδα εξαπλώνονται δύο υποείδη:

S. perfoliata subsp. *athoa*: (τσάι Άθω). Ενδημικό είδος που εξαπλώνεται στον Άθω και το όρος Φεγγάρι της Σαμοθράκης.

S. perfoliata subsp. *perfoliata*: Εξαπλώνεται στην Ελλάδα και της Ανατολική Μεσόγειο. Απαντάται ως αυτοφυές στα βουνά της Νότιας Πίνδου.

- *S. syriaca* subsp. *syriaca* (συν. *S. cretica*): (μαλοθήρα, μαλοτήρα). Ενδημικό της Κρήτης.

- *S. sipylea*: Ενδημικό είδος της Τουρκίας και των νησιών του Ανατολικού Αιγαίου (Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ικαρία).

- *S. albiflora*: Ενδημικό είδος της Τουρκίας και των νησιών του Ανατολικού Αιγαίου (Ρόδος, Σύμη).

1.2 Σύντομη περιγραφή των κυριότερων ελληνικών ειδών σιδερίτη

Τα κυριότερα είδη του σιδερίτη που απαντώνται στη χώρα μας, όπως αυτά αναφέρθηκαν προηγουμένως, είναι πολυετή. Οι βλαστοί είναι ελαφρώς ξυλοποιημένοι στη βάση τους και συχνά φέρουν πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα είναι ακέραια ή οδοντωτά. Οι ταξιανθίες φέρουν από έξι έως πολυάριθμους ανθοφόρους σπονδύλους, σε πυκνή ή αραιή διάταξη. Τα βράκτια είναι ακέραια και συνήθως δεν προσομοιάζουν σε φύλλα. Ο κάλυκας φέρει δέκα νευρώσεις και πέντε ισομεγέθεις οδοντώσεις. Η στεφάνη είναι κίτρινη, δίχειλη. Το άνθος φέρει τέσσερις στήμονες. Το καρυοειδές καρπίδιο είναι σφαιρικό και λείο (Strid & Tan, 1991).

Οι κυριότερες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των ελληνικών ειδών σιδερίτη εντοπίζονται στην παρουσία τριχιδίων, στο σχήμα των φύλλων και της ταξιανθίας, το χρώμα της ταξιανθίας και των βράκτιων φύλλων (Strid & Tan, 1991).

1.3 Στοιχεία της καλλιέργειας του σιδερίτη και καλλιεργητικές τεχνικές

Ο σιδερίτης απαντάται στην Ελλάδα τόσο ως αυτοφυές, όσο και ως καλλιεργούμενο φυτό. Όλα τα είδη που απαντώνται στη χώρα μας αυτοφύονται, όπως

αναφέρθηκε, σε μεγάλο υψόμετρο και είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες και τον παγετό. Τα φυτά του γένους *Sideritis* L. αυτοφύονται σε πετρώδη, συνήθως, εδάφη. Ωστόσο, αναφέρεται ότι δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες απαιτήσεις ως προς τον τύπο του εδάφους και τις τιμές του εδαφικού pH (Κουτσός, 2006). Το πυκνό ριζικό σύστημα που αναπτύσσουν τα καθιστά, επίσης, ελάχιστα απαιτητικά σε λίπανση και ανθεκτικά στην ξηρασία (Κουτσός, 2006).

Η εγκατάσταση της φυτείας, για τα δεδομένα της Ελλάδας, γίνεται συνήθως με σπορά ή με διαίρεση των φυτών (Κουτσός, 2006). Συγκεκριμένα, η σπορά γίνεται σε ψυχρά σπορεία το καλοκαίρι και στη συνέχεια τα νεαρά σπορόφυτα μεταφυτεύονται στο χωράφι. Όσον αφορά στον πολλαπλασιασμό με διαίρεση φυτών από παλαιότερες φυτείες, συνιστάται η επιλογή εξωτερικών πλευρικών βλαστών που διαθέτουν περισσότερο εύρωστο ριζικό σύστημα (Κουτσός, 2006). Σε κάθε περίπτωση, ως άριστη περίοδος εγκατάστασης μιας νέας φυτείας σιδερίτη θεωρείται, για τα ελληνικά δεδομένα, το φθινόπωρο (Γκόλιαρης, 1995). Η συγκομιδή των φυτών σιδερίτη περιλαμβάνει την αφαίρεση ολόκληρης της ταξιανθίας μαζί με τμήμα του στελέχους της μήκους 5-7 cm (Γκόλιαρης, 1995).

Η συγκομιδή των ανθοφόρων στελεχών του σιδερίτη συνιστάται να γίνεται στο στάδιο της πλήρους ανθοφορίας, οπότε και η περιεκτικότητά τους σε αιθέριο έλαιο είναι η μέγιστη (Κουτσός, 2006). Για τις ελληνικές συνθήκες, η περίοδος αυτή εντοπίζεται στα μέσα του καλοκαιριού (Ιούλιος) (Γκόλιαρης, 1995). Η ξήρανση των ανθοφόρων βλαστών γίνεται είτε με άπλωμα ή κρέμασμα σε μικρά δέματα υπό σκιά είτε σε ξηραντήρια (Γκόλιαρης, 1995; Κουτσός, 2006). Δείκτες καλής ξήρανσης θεωρούνται το δυνατό και ευχάριστο άρωμα και το πρασινοκίτρινο χρώμα, ενώ, αντίθετα, το κίτρινο χρώμα των βλαστών αποτελεί ένδειξη κακής ξήρανσης (Κουτσός, 2006).

Μια φυτεία σιδερίτη έχει διάρκεια ζωής, σύμφωνα με το Γκόλιαρη (1995), πέντε έως οκτώ χρόνια, με την παραγωγή να αυξάνεται από το δεύτερο ως τον τέταρτο χρόνο και να μειώνεται από τον πέμπτο. Οι μέσες αποδόσεις σε ξηρή δρόγη (ανθοφόρους βλαστούς) φτάνουν τα 50-60 kg/στρέμμα το δεύτερο και 100-120 kg/στρέμμα τον τρίτο και τέταρτο χρόνο της φυτείας (Γκόλιαρης, 1995), ενώ ο Κουτσός (2006) αναφέρει ως μέση απόδοση τα 100-150 kg/στρέμμα.

Οι βιότυποι σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα αναφέρονται ως ανθεκτικοί σε εχθρούς και ασθένειες, όταν αναπτύσσονται στα φυσικά τους ενδιαιτήματα (Κουτσός, 2006). Έτσι, η καλλιέργεια σε θέσεις με υψόμετρο και εδαφοκλιματικές συνθήκες όμοιες με αυτές του περιβάλλοντος όπου αυτοφύεται ο σιδερίτης εξασφαλίζει την ποιότητα του προϊόντος και την ελαχιστοποίηση των προβλημάτων κατά την καλλιέργεια (Γκόλιαρης, 1995; Κουτσός, 2006). Η καλλιέργεια του σιδερίτη σε υψόμετρο χαμηλότερο των 800 μέτρων παρουσιάζει συχνά προβλήματα από προσβολές εντόμων, οι οποίες αντιμετωπίζονται με τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Κουτσός, 2006). Σε χαμηλό υψόμετρο, ιδιαίτερο πρόβλημα ενδέχεται να

αποτελέσουν τα ζιζάνια, κυρίως κατά τα πρώτα χρόνια μιας φυτείας, οπότε και συνιστάται η αντιμετώπισή τους με σκαλίσματα ή/και εφαρμογή εδαφοκάλυψης (Γκόλιαρης 1995; Κουτσός, 2006).

1.4 Χημικό προφίλ

Η χημική σύσταση του σιδερίτη έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές. Ως κυριότερα συστατικά αναφέρονται αυτά του αιθέριου ελαίου, τα διτερπένια και τα φλαβονοειδή, στα οποία αποδίδεται κυρίως και η βιολογική δράση των φυτών του γένους *Sideritis* L. (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011).

Στα δευτερεύοντα συστατικά του σιδερίτη περιλαμβάνονται άλλες τερπενοειδείς (τριτερπένια, ιριδοειδή) και φαινολικές (φαινυλπροπανοειδή, λιγνάνες) ενώσεις, στερόλες και λιπαρά οξέα (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011; Fraga, 2012).

1.4.1. Αιθέριο έλαιο - πτητικές ουσίες

1.4.1.1. Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση των συστατικών του αιθερίου ελαίου

Η απομόνωση των συστατικών του αιθερίου ελαίου μπορεί να γίνει με χρήση των τεχνικών της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography – GC). Στην περίπτωση του σιδερίτη, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS), επιτρέποντας το χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ταυτόχρονη ταυτοποίηση των συστατικών του αιθερίου ελαίου. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές, χρησιμοποιείται συνήθως ως φέρον αέριο το ήλιο και μη πολική στήλη χρωματογραφίας, ενώ οι αναλύσεις πραγματοποιούνται υπό προγραμματισμένα μεταβαλλόμενη θερμοκρασία (Aligiannis *et al.*, 2001; Özcan *et al.*, 2001; Kirimer, Baser, Demirci & Duman, 2004; Pljevljakušić *et al.*, 2013).

Οι Schulz, Özkan, Baranska, Krüger & Özcan (2005) αναφέρουν, ωστόσο, ότι ο χαρακτηρισμός του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη, όπως και άλλων φυτών, μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση τεχνικών της φασματοσκοπίας IR και Raman. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι τεχνικές αυτές μπορούν να αντικαταστήσουν την αντίστοιχη της GC-MS κατά τον ποιοτικό έλεγχο των αιθέριων ελαίων, ενώ επιτρέπουν το συνεχή έλεγχο της πορείας της απόσταξης.

Η απόσταξη είναι ο πλέον διαδεδομένος τρόπος απομόνωσης πτητικών συστατικών του γένους *Sideritis*, καθώς και πολλών άλλων φυτών και τροφίμων. Είναι δυνατό να διεξάγεται μέσω ποικίλων τεχνικών οι οποίες επιλέγονται με γνώμονα κυρίως τη φύση του αναλύτη και του υλικού-μήτρας (matrix). Οι κυριότερες μέθοδοι απόσταξης συνοψίζονται στις (Ταραντίλης, Πολυσίου & Παππάς, 2013):

(a) η υδροαπόσταξη (Hydrodistillation),

(β) η υδρο-ατμοαπόσταξη (Water – Steam Distillation)

(γ) η απόσταξη με υδρατμούς (Steam Distillation),

Οι τρεις προαναφερθείσες τεχνικές απόσταξης περιλαμβάνουν την τοποθέτηση του φυτικού υλικού μέσα σε δοχείο (άμβυκα) με νερό, όπου θερμαίνεται μέχρι βρασμού με αποτέλεσμα οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί να παρασύρουν τα συστατικά του αιθερίου ελαίου από τους φυτικούς ιστούς. Στη συνέχεια, οι υδρατμοί συμπυκνώνονται με ψύξη και υγροποιούνται, οπότε τα συστατικά του αιθερίου ελαίου, λόγω διαφοράς στο ειδικό βάρος, διαχωρίζονται από το νερό.

Στην υδροαπόσταξη, το φυτικό υλικό βρίσκεται σε άμεση επαφή με το νερό που βράζει. Αντίθετα, στην υδρο-ατμοαπόσταξη, το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό, αλλά τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται λίγο ψηλότερα από την επιφάνεια του νερού. Στην απόσταξη με υδρατμούς, τέλος, δεν εισάγεται καθόλου νερό στον άμβυκα. Η απόσταξη πραγματοποιείται με την εισαγωγή υδρατμών μέσω σωληνώσεων από τον πυθμένα του άμβυκα.

(δ) η μικρο-απόσταξη με υδρατμούς - εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (Micro-Steam Distillation Extraction, MSDE)

Πρόκειται για μια πολύ κοινή διαδικασία στη μελέτη πτητικών ενώσεων σε τρόφιμα και ποτά. Ο οργανικός διαλύτης μαζί με τις πτητικές ενώσεις συγκεντρώνονται σε ειδική φιάλη και οι απώλειες των πτητικών περιορίζονται με ειδικές συσκευές-ψυκτήρες.

(ε) η απόσταξη σε κενό (Vacuum Head Space Distillation)

Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε φιάλες που συνδέονται σε σειρά με παγίδες και μία αντλία κενού. Η θερμοκρασία των παγίδων είναι ιδιαίτερα χαμηλή (~ -70°C), με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό των πτητικών ενώσεων σε αυτές και την παραλαβή τους, στη συνέχεια, μέσω της έκπλυσης των παγίδων με πτητικό διαλύτη.

Πέραν των τεχνικών απόσταξης, η παραλαβή των πτητικών συστατικών ενός φυτού μπορεί να γίνει και μέσω (Ταραντίλης κ.ά., 2013):

(στ) της παραλαβής από το χώρο πάνω από το φυτό (Head Space)

Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου μεταφέρονται, με τη βοήθεια αδρανούς αερίου, από το χώρο πάνω από το φυτό σε παγίδα με υλικό ικανό να προσροφά τις οργανικές ενώσεις. Η παραλαβή των πτητικών συστατικών γίνεται μέσω της έκλουσης της παγίδας με μικρή ποσότητα διαλύτη, ενώ η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές.

(ζ) της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid-Phase MicroExtraction, SPME)

Τα πτητικά συστατικά παραλαμβάνονται από ίνα επικαλυμμένη με κατάλληλο προσροφητικό υλικό, η οποία βυθίζεται μέσα στο εξεταζόμενο δείγμα (ή στην αέρια φάση πάνω από αυτό). Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας, η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα και το περιεχόμενο της εισάγεται σε έναν αέριο χρωματογράφο.

(η) της εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical Fluid Extraction)

Ως εκχυλιστής διαλύτης χρησιμοποιείται ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Ο εκχυλιστής εισάγεται αρχικά στο σύστημα ως υγρό το οποίο συμπιέζεται πάνω από την κρίσιμη πίεσή του με τη βοήθεια μίας αντλίας. Στη συνέχεια, το πεπιεσμένο υγρό θερμαίνεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία του πριν εισαχθεί στο θάλαμο εκχύλισης, όπου έχει τοποθετηθεί το δείγμα. Στο εσωτερικό του θαλάμου εκχύλισης η πίεση ελαττώνεται με αποτέλεσμα το υπερκρίσιμο ρευστό να εξατμίζεται και οι υπό μελέτη ενώσεις να παραλαμβάνονται στο θάλαμο συλλογής, ο οποίος αποτελεί συνήθως μία παγίδα στερεής φάσης. Συχνά χρησιμοποιείται ως υπερκρίσιμο ρευστό το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), καθώς είναι φυσικό, μη εύφλεκτο και χημικά αδρανές. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση περιβαλλοντικών, φαρμακευτικών,

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη γίνεται συνήθως με απόσταξη με υδρατμούς ή υδροαπόσταξη του αποξηραμένου υπέργειου τμήματος των φυτών σε συσκευή Clevenger (Aligiannis *et al.*, 2001; Özcan *et al.*, 2001; Kirimer *et al.*, 2004; Pljevljakušić *et al.*, 2011; Koutsaviti *et al.*, 2013). Το αιθέριο έλαιο παραλαμβάνεται και με εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂, υπό κατάλληλες συνθήκες (10 MPa, 40 °C, ροή CO₂ 0,67 kg/h), όπως περιγράφεται από τους Tadić *et al.* (2012).

1.4.1.2 Απόδοση σε αιθέριο έλαιο

Το φυτά του γένους Sideritis L. χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα χαμηλή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, στοιχείο που έρχεται σε αναντιστοιχία με τη γενική εικόνα των φυτών της οικογένειας Lamiaceae (Gonzáles-Burgos et al., 2011). Ωστόσο, εντός της οικογένειας Lamiaceae, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των υποοικογενειών Lamioideae και Nepetoideae (Tomás-Barberán & Wollenweber, 1990). Η πρώτη, στην οποία ανήκει και το γένος Sideritis, χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο, την παρουσία ιριδοειδών και την απουσία ροσμαρινικού οξέος. Αντίθετα, η υποοικογένεια Nepetoideae είναι πλούσια σε αιθέριο έλαιο, περιέχει ροσμαρινικό οξύ, ενώ απουσιάζουν από αυτή τα ιριδοειδή.

Η περιεκτικότητα του σιδερίτη, όπως και των υπολοίπων αρωματικών φυτών, σε αιθέριο έλαιο και η σύσταση αυτού επηρεάζονται ισχυρά από πλήθος παραγόντων, όπως ο γονότυπος του φυτού, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, η καλλιεργητική πρακτική που ακολουθείται, αλλά και οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ελληνικών δειγμάτων επιβεβαιώνουν τη χαμηλή περιεκτικότητα των φυτών του σιδερίτη σε αιθέριο έλαιο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Aligiannis *et al.* (2001), η περιεκτικότητα πέντε ειδών και υποειδών σιδερίτη σε αιθέριο έλαιο κυμάνθηκε από 0,12% (*Sideritis raeseri* subsp. *raeseri*) έως 0,40% (*S. sipylea*). Συγκρίσιμα αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Koutsaviti *et al.* (2013), με την απόδοση των εξεταζόμενων ελληνικών δειγμάτων σε αιθέριο έλαιο να κυμαίνεται μεταξύ 0,10% (*S. euboea*) και 0,60% (*S. clandestina* subsp. *peloponnesiaca*), με μόνη εξαίρεση το *S. lanata*, για το οποίο η αντίστοιχη τιμή ήταν 0,94%.

Κατά την ανάλυση 50 διαφορετικών βοτανικών ειδών και υποειδών σιδερίτη από την Τουρκία, η απόδοσή τους σε αιθέριο έλαιο βρέθηκε να κυμαίνεται από ίχνη (>0,01%) έως και 0,85% (Kirimer *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η απόδοση σε αιθέριο έλαιο σχετίζεται με τη χημική σύσταση αυτού. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές υπογραμμίζουν ότι οι υψηλότερες αποδόσεις παρουσιάστηκαν σε φυτά των οποίων το αιθέριο έλαιο ήταν πλούσιο σε μη οξυγονούχα μονοτερπένια, ενώ, αντίθετα, οι χαμηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν σε αιθέρια έλαια με υψηλά ποσοστά σεσκιτερπενίων.

Επιπλέον παράγοντα που επηρεάζει την απόδοση φυτών σιδερίτη σε αιθέριο έλαιο αναφέρεται ότι αποτελεί το στάδιο ανάπτυξης του φυτού κατά τη συγκομιδή. Η ανάλυση φυτικού υλικού Sideritis raeseri subsp. raeseri από την Ελλάδα που καλλιεργήθηκε στη Σερβία ανέδειξε ότι η περιεκτικότητα του υπέργειου τμήματος σε αιθέριο έλαιο ήταν υψηλότερη και ίση με 0,11% σε φυτά που συγκομίστηκαν στο στάδιο της πλήρους άνθησης (Pljevljakušić et al., 2011). Η τιμή αυτή δε διέφερε σημαντικά από τις αντίστοιχες για φυτά στα στάδια της εμφάνισης μπουμπουκιών και έναρξης της άνθησης, ενώ η απόδοση σε αιθέριο έλαιο εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη στο τέλος της άνθησης, κατά την αρχή σχηματισμού των σπόρων.

Τέλος, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο διαφοροποιείται και ως αποτέλεσμα της τεχνικής που ακολουθείται για την παραλαβή του. Η απόδοση φυτικού υλικού *Sideritis scardica* σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,03% όταν εφαρμόστηκε υδροαπόσταξη, ενώ η αντίστοιχη τιμή για την εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ ήταν 1,04% (Tadić *et al.*, 2012). Ωστόσο, η σύγκριση των μεθόδων παραλαβής δε μπορεί παρά να λαμβάνει υπόψη και τις διαφορές που προκαλούνται στη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου, όπως και την επίδραση που αυτές έχουν στην ποιότητά του.

1.4.1.3. Σύσταση αιθερίου ελαίου

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη δεν είναι ομοιόμορφη, αλλά επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, όπως το βοτανικό είδος ή και υποείδος στο οποίο ανήκει το εξεταζόμενο φυτικό δείγμα, οι εδαφικές και κλιματικές συνθήκες στην περιοχή όπου αναπτύσσεται το φυτό, το στάδιο ανάπτυξης κατά τη συγκομιδή, η καλλιεργητική πρακτική που εφαρμόζεται, αλλά και οι τεχνικές που ακολουθούνται κατά την παραλαβή και ανάλυση του αιθερίου ελαίου.

Σε αναλύσεις που έγιναν σε δείγματα σιδερίτη από την Ελλάδα ταυτοποιήθηκαν τα κυριότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου του υπέργειου τμήματος πέντε ειδών και υποειδών, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακας 1 (Aligiannis et al., 2001). Το απινένιο ήταν το κυρίαρχο συστατικό των Sideritis clandestina subsp. clandestina, S. raeseri subsp. attica και S. sipylea, σε ποσοστά 20,11%, 24,85% και 35,21% αντίστοιγα. Στο αιθέριο έλαιο του S. raeseri subsp. raeseri το συστατικό που εμφανίστηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση ήταν το β-πινένιο (9,06%). Ωστόσο, οι ερευνητές υπογραμμίζουν ότι και στην περίπτωση αυτή κυριαρχούν τα μη οξυγονούχα μονοτερπένια με συνολικό ποσοστό 30,18%. Σαφής διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στο αιθέριο έλαιο του S. syriaca ssp. syriaca, όπου τα μη οξυγονούχα μονοτερπένια εμφάνισαν συγκέντρωση 18,35% και κυρίαρχο συστατικό ήταν η καρβακρόλη (33,68%). Παράλληλα με τη διαφοροποίηση ως προς το κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου, κάθε αιθέριο έλαιο χαρακτηρίστηκε και από την παρουσία, σε σχετικά υψηλά ποσοστά, επιμέρους συστατικών τα οποία είχαν μικρή συγκέντρωση ή απουσίαζαν από τα υπόλοιπα δείγματα. Το S. clandestina subsp. clandestina χαρακτηρίστηκε από την παρουσία γερμακρενίου-D (6,13%) και αμπισαμπολόλης (7,06%), το S. raeseri subsp. raeseri από το Ar-κουρκουμένιο (6,14%), to S. raeseri subsp. attica and ta δ -3-kapévio (5,77%) και α-τερπινένιο

(5,84%), ενώ το S. sipylea από το β-μυρκένιο (7,63%) και την 1,8-κινεόλη (8,43%). Τέλος, το β-(Ε)-καρυοφυλλένιο βρέθηκε σε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση (8,47%) στο αιθέριο έλαιο του S. syriaca ssp. syriaca.

	Ένωση	S. clandestina subsp. clandestina	S. raeseri subsp. raeseri	S. S. raeseri raeseri subsp. subsp. raeseri attica		S. syriaca subsp. syriaca
1	α-πινένιο	20,11	3,63	24,85	35,21	3,14
2	β-πινένιο	7,31	9,06	17,99	8,75	1,95
3	β-μυρκένιο	0,37	0,95	2,40	7,63	0,60
4	δ-3-καρένιο	0,30	1,18	5,77	-	0,84
5	α-τερπινένιο	0,38	0,89	5,84	0,23	0,94
6	1,8-κινεόλη	-	0,56	0,31	8,43	-
7	καρβακρόλη	-	0,85	-	4,52	33,68
8	β-(Ε)-καρυοφυλλένιο	3,45	4,17	4,56	3,17	8,47
9	γερμακρένιο-D	6,13	-	-	-	-
10	Ar-κουρκουμένιο	-	6,14	0,47	0,33	1,13
11	δικυκλογερμακρένιο	-	3,27	4,02	3,13	5,29
12	α-μπισαμπολόλη	7,06	1,26	-	-	0,29

Πίνακας 1 Κυριότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου πέντε ειδών και υποειδών σιδερίτη από την Ελλάδα [τροποποίηση από Aligiannis *et al.* (2001)].



Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες αποτελούν επιπλέον παράγοντα που επηρεάζει τη σύσταση του αιθερίου ελαίου. Οι Koutsaviti *et al.* (2013) εξέτασαν, μεταξύ άλλων, δύο ελληνικά δείγματα του *S. clandestina* subsp. *peloponnesiaca* ως προς τη σύσταση του αιθερίου ελαίου τους. Τα δείγματα είχαν συλλεχθεί σε διαδοχικές χρονιές, το πρώτο από το όρος Σαϊτάς και το δεύτερο από το Χελμό. Το δείγμα από το Σαϊτά βρέθηκε να περιέχει κυρίως μονοτερπένια (46,6%), ενώ το ποσοστό των σεσκιτερπενίων ήταν 35,6%. Κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου ήταν το *α*-πινένιο με ποσοστό 35,4%. Αντίθετα, το δείγμα από το Χελμό περιείχε 18,9% μονοτερπένια, 18,5% σεσκιτερπένια και 25% διτερπένια, με την ισοαμπιενόλη (**Γράφημα 3**, ένωση 18) να αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου (18,3%).

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη μεταβάλλεται κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Σε πειράματα με ελληνικό φυτικό υλικό *S. raeseri* subsp. *raeseri* που καλλιεργήθηκε στη Σερβία εξετάστηκε η σύσταση του αιθερίου ελαίου σε τέσσερα στάδια ανάπτυξης: (i) κατά την εμφάνιση των μπουμπουκιών, (ii) στην αρχή της άνθησης, (iii) στην πλήρη ανθοφορία και (iv) στο τέλος της ανθοφορίας, κατά την αρχή σχηματισμού των σπόρων (Pljevljakušić *et al.*, 2011). Όπως παρουσιάζεται στο *Γράφημα* 2, τα μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα συστατικών καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του φυτού, με τα ποσοστά τους να κυμαίνονται μεταξύ 30,7% και 55,4% επί του συνόλου του αιθερίου ελαίου. Κατά τα τρία πρώτα στάδια ανάπτυξης ακολουθούν, κατά φθίνουσα σειρά, τα οξυγονούχα διτερπένια, οξυγονούχα σεσκιτερπένια και μη οξυγονούχα μονοτερπένια.



Γράφημα 2 Ομάδες συστατικών του αιθερίου ελαίου S. raeseri subsp. raeseri σε τέσσερα στάδια ανάπτυξης (Pljevljakušić *et al.*, 2011).

Αντίθετα, στο τέλος της άνθησης παρατηρείται αύξηση των οξυγονούχων σεσκιτερπένιων και μη οξυγονούχων μονοτερπενίων και μείωση του ποσοστού των οξυγονούχων διτερπενίων. Κύριο συστατικό του εξεταζόμενου αιθερίου ελαίου ήταν, στο σύνολο των τεσσάρων σταδίων, το δικυκλογερμακρένιο. Το χαμηλότερο ποσοστό της ένωσης αυτής παρατηρήθηκε κατά την εμφάνιση των μπουμπουκιών (35,8%), ενώ το υψηλότερο στην πλήρη ανθοφορία, οπότε και έφτασε το 42,5% επί του συνόλου του αιθερίου ελαίου.

Η μέθοδος που ακολουθείται για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου επηρεάζει σημαντικά την ποιοτική και ποσοτική του σύσταση. Οι Tadić *et al.* (2012) εξέτασαν, μεταξύ άλλων, τη σύσταση του αιθερίου ελαίου από το φυτό *Sideritis scardica*, εφαρμόζοντας υδροαπόσταξη και εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ για την παραλαβή του.

Πίνακας 2 Συγκέντρωση (% του συνόλου του αιθερίου ελαίου) των διάφορων ομάδων συστατικών στο αιθέριο έλαιο *Sideritis scardica* που παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη και με εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ [τροποποίηση απόTadić *et al.* (2012)].

Ομάδες συστατικών αιθερίου ελαίου	Παραλαβή με υδροαπόσταζη	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO2
μη οξυγονούχα μονοτερπένια	1,83	1,57
οξυγονούχα μονοτερπένια	30,01	-
μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια	8,63	3,97
οξυγονούχα σεσκιτερπένια	25,54	5,61
διτερπένια	4,97	33,75
λιπαρά οξέα, εστέρες, αλδεΰδες, αλκοόλες	15,96	41,16
υδρογονάνθρακες	2,16	1,63
άλλες ενώσεις	0,02	-
συνολικό ποσοστό συστατικών που ταυτοποιήθηκαν	89,12	87,69

Οι ομάδες των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν και το αντίστοιχο ποσοστό τους επί του συνόλου του αιθερίου ελαίου παρουσιάζονται στον Πίνακας 2. Στο αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη κυριαρχούν τα οξυγονούχα μονοτερπένια (30,01%), ακολουθούμενα από τα οξυγονούχα σεσκιτερπένια (25,54%). Αντίθετα, στην περίπτωση της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂ εμφανίστηκαν σε ποσοστό 41,16% λιπαρά οξέα, εστέρες, αλδεΰδες και αλκοόλες, ενώ το 33,75% του αιθερίου ελαίου αποτελούνταν από διτερπένια.

Η διαφοροποίηση στη σύσταση του αιθερίου ελαίου ακόμη και μεταξύ δειγμάτων με κοινή βοτανική ταξονόμηση και γεωγραφική προέλευση ενδέχεται να οφείλεται σε πλήθος παραγόντων, ωστόσο υπογραμμίζει την ανάγκη διάκρισης και ταξινόμησης των φυτών βάσει του χημειότυπού τους, προκειμένου να διευκολυνθεί η μελέτη τους σε επιστημονικό και ερευνητικό επίπεδο. Παράλληλα, η διάκριση με βάση το χημειότυπο του φυτού μπορεί να αποτελέσει ένα αντικειμενικό σημείο αναφοράς κατά την εμπορική αξιοποίηση του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη.

1.4.1.4 Χημειοταζινόμηση βάσει του αιθερίου ελαίου

Η σύσταση του αιθερίου ελαίου είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως χημειοταξινομικό κριτήριο για τη διάκριση μεταξύ των φυτών του γένους Sideritis.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με 53 βοτανικά είδη και υποείδη από την Τουρκία, τα φυτά κατηγοριοποιήθηκαν σε έξι ομάδες με κριτήριο το κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου τους (Baser, 2002). Διακρίθηκαν ομάδες πλούσιες σε: (*i*) μονοτερπένια, (*ii*) οξυγονούχα μονοτερπένια, (*iii*) σεσκιτερπένια, (*iv*) οξυγονούχα σεσκιτερπένια, (*v*) διτερπένια και (*vi*) άλλες ενώσεις.

Τα διάφορα είδη και υποείδη σιδερίτη από την Τουρκία που εξετάστηκαν περιέχουν σε ποσοστό περίπου 66% μη οξυγονούχα μονοτερπένια ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου τους, 32% μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια, 5% οξυγονούχα μονοτερπένια, 3% οξυγονούχα σεσκιτερπένια, 2% διτερπένια και 2% άλλες ενώσεις (Baser, 2002). Τα φυτά σιδερίτη από την Τουρκία που ανήκουν στην ομάδα των μη οξυγονούχων μονοτερπενίων περιέχουν συνήθως ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου τους α- ή/και β-πινένιο και μυρκένιο, ενώ αυτά της ομάδας των μη οξυγονούχων σεσκιτερπενίων β-καρυοφυλλένιο και γερμακρένιο-D (Kirimer *et al.*, 2004).

1.4.2 Διτερπένια του σιδερίτη

Τα φυτά του γένους Sideritis L. χαρακτηρίζονται από την παρουσία διτερπενίων. Αναφέρεται ότι περισσότερες από 160 διτερπενοειδείς ενώσεις, με εξαιρετική δομική ποικιλομορφία, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από το υπέργειο τμήμα φυτών σιδερίτη (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011).

1.4.2.1 Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση διτερπενίων

Οι διτερπενοειδείς ενώσεις που αποτελούν συστατικά του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη μπορούν να παραληφθούν, διαχωριστούν και ταυτοποιηθούν με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Ενότητα 1.4.1.1). Διτερπένια που περιέχονταν στο αιθέριο έλαιο του υπέργειου τμήματος ελληνικών δειγμάτων σιδερίτη (Sideritis clandestina subsp. peloponnesiaca, S. clandestina subsp. clandestina, S. euboea, S. *romana* subsp. *purpurea*, *S. lanata*) αναλύθηκαν μέσω GC-MS από τους Koutsaviti *et al.* (2013).

Η γενική πορεία για τη μελέτη των διτερπενίων του σιδερίτη περιλαμβάνει την παραλαβή τους με εκχύλιση του φυτικού υλικού, το χρωματογραφικό διαχωρισμό τους και την ταυτοποίησή τους με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, για την παραλαβή των τερπενοειδών, χρησιμοποιείται το αποξηραμένο υπέργειο τμήμα του σιδερίτη, το οποίο εκχυλίζεται σε συσκευή Soxhlet. Ως διαλύτες ενδεικτικά αναφέρονται το εξάνιο (García-Granados, Martínez, Molina & Onorato, 1986), ο πετρελαϊκός αιθέρας (Loğoğlu, Arslan, Öktemer & Şakıyan, 2006) και η αιθανόλη (Fraga, Hernández, Fernández & Santana, 2009).

Για την απομόνωση των τερπενοειδών έχει χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία στήλης. Στα συστήματα διαλυτών έκλουσης που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται εξάνιο: χλωροφόρμιο: ακετόνη: μεθανόλη (Topçu, Gören, Kılıç, Yıldız & Tümen, 2002), πετρελαϊκός αιθέρας: διαιθυλαιθέρας: μεθανόλη (Loğoğlu *et al.*, 2006) και πετρελαϊκός αιθέρας: οξικός αιθυλεστέρας (Fraga *et al.*, 2009). Ο καθαρισμός των ενώσεων που παραλαμβάνονται μπορεί να επιτευχθεί με χρήση της τεχνικής της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography -TLC) (Topçu *et al.*, 2002; Kilic, Yildiz, Goren, Tumen & Topcu, 2003; Loğoğlu *et al.*, 2006).

Η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών. Για τα διτερπενοειδή του σιδερίτη έχουν χρησιμοποιηθεί η υπέρυθρη φασματοσκοπία, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR και ¹³C-NMR), η φασματομετρία μαζών, αλλά και συνδυασμός των μεθόδων αυτών (García-Granados *et al.*, 1986; Topçu *et al.*, 2002; Kilic, *et al.*, 2003; Loğoğlu *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2009; Halfon, Gören, Ertaş &Topçu, 2011).

1.4.2.2 Διτερπένια των κυριότερων ελληνικών ειδών σιδερίτη

Τα διτερπένια τα οποία έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα αναφέρονται στον *Πίνακα 3*, ενώ οι αντίστοιχες δομές παρουσιάζονται στο **Γράφημα 3**.

Οι εργασίες των Venturella & Bellino (1977) και Koutsaviti *et al.* (2013) αναφέρονται σε φυτικό υλικό από την Ελλάδα. Αντίθετα, τα πειράματα των Kilic *et al.* (2003) και Halfon *et al.* (2011) πραγματοποιήθηκαν με φυτικό υλικό από την Τουρκία το οποίο ανήκε, ωστόσο, σε βοτανικά είδη που απαντώνται και στη χώρα μας. Τέλος, στον Πίνακα 3 περιλαμβάνονται πληροφορίες από την ανασκόπηση της

βιβλιογραφίας που πραγματοποιήθηκε από τον Fraga (2012). Θεωρήθηκε σκόπιμο να περιληφθούν οι πληροφορίες που αναφέρονται στο *Sideritis theezans*, καθώς δεν αποτελεί διαφορετικό είδος, αλλά είναι συνώνυμο του *Sideritis clandestina* που απαντάται στη χώρα μας (Papanikolaou & Kokkini, 1982).

Σε ότι αφορά στη δομή τους, τα διτερπένια των κυριότερων ειδών σιδερίτη που υπάρχουν στην Ελλάδα ανήκουν στην ομάδα των παραγώγων του *ent*-καουρανίου, με εξαίρεση την ισοαμπιενόλη, η οποία αποτελεί παράγωγο του *ent*-μπεγερανίου.

1.4.2.3 Χημειοταζινόμηση βάσει των διτερπενίων

Η σύσταση των φυτών σιδερίτη σε διτερπένια αποτελεί κριτήριο για τη διάκριση και χημειοταξινόμησή τους. Έτσι, σύμφωνα με τον Fraga (2012), τα είδη του γένους *Sideritis* που απαντώνται στη Μεσόγειο μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις φυτοχημικές ομάδες:

(α) Ομάδα Ι

Περιλαμβάνει τα είδη του σιδερίτη που χαρακτηρίζονται από την απουσία διτερπενίων και την παρουσία τριτερπενίων ή στερολών. Στην ομάδα αυτή ανήκουν είδη των βοτανικών αθροισμάτων *Hesiodia* και *Burgsdorfia*, τα οποία θεωρούνται εξελικτικά τα παλαιότερα αθροίσματα του γένους *Sideritis*.

<i>∆оµ</i> ή*	Ένωση	Sideritis raeseri	Sideritis clandestina	Sideritis scardica	Sideritis euboea	Sideritis athoa	Sideritis syriaca	Αναφορά
1	φολιόλη					+		Kilic <i>et al.</i> , 2003
2	σιδόλη		+			+		Kilic et al. ,2003;Fraga, 2012
3	λινεαρόλη		+			+		Kilic et al. ,2003;Fraga, 2012
4	ισοφολιόλη		+		+			Fraga, 2012
5	ισολινεαρόλη			+				Fraga, 2012
6	18-ακετυλολευκανθόλη			+				Fraga, 2012
7	σιδεριδιόλη	+	+		+		+	Fraga, 2012
8	σιδερόλη	+	+	+	+		+	Fraga, 2012
9	σιδεροξόλη	+	+	+	+		+	Fraga, 2012
10	εποξυσιδερόλη	+		+	+		+	Fraga, 2012
11	ευβοτριόλη				+			Venturella & Bellino, 1977
12	ευβόλη			+	+			Venturella & Bellino, 1977; Fraga, 2012
13	εποξυϊσολινεαρόλη	+	+					Fraga, 2012

Πίνακας 3 Διτερπενοειδείς ενώσεις από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα.
∆оµή*	Ένωση	Sideritis raeseri	Sideritis clandestina	Sideritis scardica	Sideritis euboea	Sideritis athoa	Sideritis syriaca	Αναφορά
14	αθωνολόνη					+		Kilic <i>et al.</i> ,2003
15	3α,7β-διυδροξυ- <i>ent</i> -καουρ-16- ένιο					+		Halfon et al., 2011
16	καναδιόλη					+		Fraga et al., 2003
17	7-ακετυλοεπικανδικανδιόλη					+		Fraga, 2012
18	ισοαμπιενόλη		+		+			Koutsaviti et al.,2013
19	7α,18-διυδροξυ- <i>ent</i> -μπεγερ- 15-ένιο					+		Kilic <i>et al.</i> , 2003

* Οι δομές παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.



Γράφημα 3 Δομές των διτερπενοειδών ενώσεων από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα..

(β) Ομάδα ΙΙ

Περιλαμβάνει τα είδη που περιέχουν δικυκλικά διτερπένια της ομάδας του λαβδανίου ή του οξειδίου του λαβδανίου. Εδώ ανήκουν είδη των αθροισμάτων Sideritis που απαντώνται στη δυτική Μεσόγειο.

(γ) Ομάδα ΙΙΙ

Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα είδη σιδερίτη που εμφανίζουν ως κύρια συστατικά τετρακυκλικά διτερπένια, παράγωγα του *ent*-καουρενίου. Περιλαμβάνονται είδη του αθροίσματος *Sideritis*, ενώ στην ομάδα αυτή κατατάσσεται, επίσης, το σύνολο των φυτών του αθροίσματος *Empedoclea*, ειδών ενδημικών της ανατολικής Μεσογείου και των Βαλκανίων.

(δ) Ομάδα IV

Αποτελείται από τα είδη του σιδερίτη των οποίων οι κύριες διτερπενοειδείς ενώσεις αποτελούν παράγωγα του ent-μπεγερανίου και/ή του ent-ατισανίου. Στην ομάδα αυτή ταξινομούνται ορισμένα είδη από την Ισπανία που ανήκουν στο άθροισμα Sideritis. Ο σχηματισμός περισσότερο εξελιγμένων διτερπενίων αποτελεί, κατά τον Fraga (2012), ένδειξη ότι τα είδη που ανήκουν στην ομάδα αυτή είναι εξελικτικά νεότερα των υπολοίπων Μεσογειακών ειδών του γένους Sideritis.

1.4.3 Φλαβονοειδή του σιδερίτη

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και αποτελούν μία μεγάλη και σπουδαία κατηγορία φυσικών προϊόντων. Είναι γνωστά εδώ και πολλές δεκαετίες και έχουν αποτελέσει αντικείμενο πλήθους ερευνητικών εργασιών. Πολλά φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί από φυτικά είδη διαφόρων οικογενειών, όπως Asteraceae, Leguminosae, Polypodiaceae, Rutaceae, Betulaceae, Lamiaceae, Rosaceae, Didieraceae. Τα φλαβονοειδή συχνά αποτελούν συστατικά της δίαιτας σημαντικού αριθμού φυτοφάγων και παμφάγων ειδών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Η ημερήσια λήψη φλαβονοειδών από τον άνθρωπο στις Δυτικές χώρες υπολογίζεται στα 23 mg περίπου, με τα φρούτα και τα λαχανικά να αποτελούν τις κύριες πηγές (Παληογιάννη, 2007). Τα φυτά του σιδερίτη χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα πλούσια σε φλαβονοειδή (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011). Βάσει του φυτικού ιστού στον οποίο απαντώνται, τα φλαβονοειδή διακρίνονται, σύμφωνα με τη Γαβριέλη (1991), σε:

<u>(α) εσωτερικά</u>

Βρίσκονται στο εσωτερικό των χυμοτοπίων των κυττάρων. Πρόκειται για γλυκοζίτες με υδρόφιλες ιδιότητες και

<u>(β) εξωτερικά</u>

Περιέχονται σε αδένες του φυτού ή στο εσωτερικό μιας ρητίνης που αποτελείται κυρίως από τερπένια και καλύπτει τα νεαρά φύλλα και τους βλαστούς. Είναι άγλυκες ενώσεις και παρουσιάζουν λιπόφιλες ιδιότητες.

1.4.3.1. Σύνθεση φλαβονοειδών

Από χημικής άποψης, τα φλαβονοειδή είναι φαινολικά παράγωγα που συνίστανται από 15 τουλάχιστον άτομα άνθρακα (2 βενζολικούς πυρήνες ενωμένους με μία αλυσίδα 3 ατόμων άνθρακα), δομή που αναφέρεται και ως C_6 - C_3 - C_6 (Γράφημα 4) (Παληογιάννη, 2007).



Γράφημα 4 Σύστημα C₆-C₃-C₆

1.4.3.2.Παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση των φλαβονοειδών

Οι τεχνικές που ακολουθούνται για την παραλαβή των φλαβονοειδών του σιδερίτη εξαρτώνται από το φυτικό ιστό στον οποίο αυτά βρίσκονται (εξωτερικά ή εσωτερικά φλαβονοειδή) και από το αν η ανάλυση στοχεύει στη μελέτη των γλυκοζιτών ή των άγλυκων φλαβονοειδών.

Τα εξωτερικά φλαβονοειδή, ως άγλυκες ενώσεις, μπορούν να παραληφθούν με εκχύλιση με μη πολικούς διαλύτες χωρίς να έχει προηγηθεί λειοτρίβηση του φυτικού υλικού (Tomás-Barberán & Wollenweber, 1990). Στην περίπτωση των εσωτερικών φλαβονοειδών, το φυτικό υλικό αργικά εκγυλίζεται με διαλύτη γαμηλής πολικότητας (πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο) για την απομάκρυνση των λιποειδών (Tsaknis & Lalas, 2005; Plioukas, Termentzi, Gabrieli, Zervou, Kefalas & Kokkalou, 2010). Για την παραλαβή των γλυκοζιδίων των φλαβονοειδών, ακολουθούν διαδογικές εκγυλίσεις με συστήματα διαλυτών. Συνήθως πραγματοποιείται εκχύλιση με μεθανόλη και, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, διαδοχικές εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη (Tsaknis & Lalas, 2005; Plioukas et al., 2010). Ωστόσο, είναι σύνηθες να μελετώνται αρχικά τα άγλυκα τμήματα, με δεδομένη την πολυπλοκότητα των γλυκοζιτικών μορφών και την απουσία προτύπων ενώσεων των γλυκοζιδίων των φλαβονοειδών (Janeska, Stefova & Alipieva, 2007). Στην περίπτωση αυτή, παράλληλα με την απομάκρυνση των λιποειδών γίνεται όξινη υδρόλυση και ακολουθεί εκγύλιση για την παραλαβή των άγλυκων φλαβονοειδών (Janeska et al., 2007).

Η απομόνωση των φλαβονοειδών μπορεί να γίνει με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, ενώ η ταυτοποίησή τους επιτυγχάνεται μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών. Παράλληλα, η ταυτοποίηση μπορεί να βασιστεί και στη σύγκριση με πρότυπες ενώσεις, όπου αυτό είναι δυνατό.

Για τη μελέτη των φλαβονοειδών του σιδερίτη έχει χρησιμοποιηθεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία υπεριώδους ή/και τη φασματομετρία μαζών (Tsaknis & Lalas, 2005; Janeska *et al.*, 2007; Plioukas *et al.*, 2010; Petreska Stanoeva & Stefova, 2012; Vasilopoulou *et al.*, 2013). Για την απομόνωση των φλαβονοειδών έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης, η χρωματογραφία στήλης και η TLC (Tsaknis & Lalas, 2005). Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR και ¹³C-NMR) έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση της δομής των φλαβονοειδών του σιδερίτη (Tsaknis & Lalas, 2005; Plioukas *et al.*, 2010; Vasilopoulou *et al.*, 2013).

1.4.3.3. Ανάλυση των φλαβονοειδών των φυτών του γένους Sideritis L.

Τα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από τα κυριότερα είδη σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα αναφέρονται στον Πίνακας 4. Οι εργασίες των Gabrieli, Kefalas & Kokkalou (2005), Tsaknis & Lalas (2005), Plioukas et al. (2010) και Vasilopoulou et al. (2013) αναφέρονται σε φυτικό υλικό από την Ελλάδα. Αντίθετα, τα πειράματα των Janeska et al. (2007) και Petreska Stanoeva & Stefova (2012) πραγματοποιήθηκαν με φυτικό υλικό από την ΠΓΔΜ το οποίο ανήκε, ωστόσο, σε βοτανικά είδη που απαντώνται και στη χώρα μας. Στον Πίνακας 4 έχουν παραληφθεί οι πληροφορίες που αφορούν στη γλυκοζιτική μορφή των φλαβονοειδών. Στις περιπτώσεις που δεν αφορούσαν στα άγλυκα τμήματα, τα φλαβονοειδώ εμφανίστηκαν με τη μορφή 7-Ο-γλυκοζιτών (Gabrieli et al., 2005; Plioukas et al., 2010; Petreska Stanoeva & Stefova, 2012; Vasilopoulou et al., 2013). Κοινό χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών τα οποία αναφέρονται ως συστατικά των ειδών σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα αποτελεί η παρουσία OH στις θέσεις 5 και 7.

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των φλαβονοειδών του σιδερίτη επηρεάζεται, μεταξύ άλλων, από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής όπου αναπτύσσεται το φυτό. Τα εξωτερικά φλαβονοειδή εμφανίζονται σε υψηλότερο ποσοστό σε φυτά σιδερίτη που αναπτύσσονται σε ξηρικά περιβάλλοντα. Ο ρόλος τους ως μηχανισμού προσαρμογής υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι είδη στα οποία απουσιάζουν τα εξωτερικά φλαβονοειδή έχουν υιοθετήσει ως προσαρμογή την κάλυψη των φύλλων τους από πυκνό τρίχωμα (Tomás-Barberán & Wollenweber, 1990). Γενικά, η παρουσία φλαβονοειδών στους εξωτερικούς φυτικούς ιστούς θεωρείται χαρακτηριστικό των περισσότερο εξελιγμένων ειδών σιδερίτη (Fraga, 2012).

Δομή	Ένωση	Sideritis raeseri	Sideritis clandestina	Sideritis scardica	Sideritis euboea	Sideritis syriaca	Αναφορά
1	υπολαετίνη	+		+			Janeska et al., 2007; Petreska Stanoeva & Stefova, 2012
2	3'-OMe-υπολαετίνη	+		+			Janeska et al., 2007
3	4'-ΟΜε-υπολαετίνη	+		+		+	Gabrieli et al., 2005; Plioukas et al., 2010 ; Petreska Stanoeva & Stefova, 2012
4	ισοσκουτελλαρεΐνη	+	+	+		+	Janeska et al., 2007; Plioukas et al., 2010 ; Vasilopoulou et al., 2013
5	4'-OMe-ισοσκουτελλαρεΐνη	+		+		+	Janeska et al., 2007; Plioukas et al., 2010
6	απιγενίνη	+	+	+		+	Janeska et al., 2007 ; Plioukas et al., 2010; Vasilopoulou et al., 2013
7	χρυ σ οεριόλη			+			Janeska <i>et al.</i> , 2007
8	λουτεολίνη			+			Petreska Stanoeva & Stefova, 2012
9	καμφερόλη				+		Tsaknis & Lalas, 2005

Πίνακας 4 Φλαβονοειδή των κυριότερων ειδών σιδερίτη που απαντώνται στην Ελλάδα.



1.4.3.4. Χημειοταξινόμηση βάσει των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν χημειοταξινομικό δείκτη και επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των ειδών, αλλά και των υβριδίων του σιδερίτη (Γαβριέλη, 1991). Τα εξωτερικά φλαβονοειδή αποτελούν περισσότερο αξιόπιστο δείκτη από ότι τα εσωτερικά, καθώς υφίστανται μικρότερες αλλοιώσεις λόγω της δράσης των διάφορων ενζύμων (Γαβριέλη, 1991).

Η σύσταση των φλαβονοειδών συσχετίζεται με τη γεωγραφική προέλευση των ειδών του σιδερίτη (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011). Έτσι, οι φλαβόνες των ειδών που προέρχονται από τη Μακαρονησία (Αζόρες, Κανάρια Νησιά, Μαδέιρα, Νήσοι Πράσινου Ακρωτηρίου) χαρακτηρίζονται από την παρουσία οξυγόνου στις θέσεις 5, 6 και 7. Τα μεσογειακά είδη παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονών που φέρουν οξυγόνο στις θέσεις 5, 6, 7 και 8.

Η σύσταση των φλαβονοειδών διαφοροποιείται και μεταξύ των αθροισμάτων που περιλαμβάνονται στο βοτανικό υποείδος Sideritis (Fraga, 2012). Τα είδη του αθροίσματος Sideritis χαρακτηρίζονται από την παρουσία 8-υδροξυφλαβονών, ενώ σε αυτά του αθροίσματος Hesiodia παρουσιάζονται συνήθως φλαβόνες μη υδροξυλιωμένες στη θέση αυτή (απιγενίνη, χρυσοεριόλη, λουτεολίνη). Αντίστοιχη διάκριση μπορεί να γίνει και μεταξύ των αθροισμάτων του υποείδους Marrubiastrum (Bojović, Janković, Potpara & Tadić, 2011). Έτσι, η υψηλή συγκέντρωση γλυκοζιτών 8-υδροξυφλαβονών διαφοροποιεί τα είδη του αθροίσματος Marrubiastrum από αυτά των αθροισμάτων *Empedocleopsis* και Creticae.

1.5 Βιολογική δράση του σιδερίτη

Η βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου και εκχυλισμάτων σιδερίτη, όπως και συστατικών που έχουν απομονωθεί από το φυτό έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν, μεταξύ άλλων, την αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αναλγητική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και εντομοκτόνο δράση του σιδερίτη, ενώ έχει αναδειχτεί η δυνατότητα χρήσης του ως εκλεκτικού τροποποιητή οιστρογονικών υποδοχέων, όπως και ως παράγοντα πρόληψης και αντιμετώπισης του έλκους και παρεμπόδισης των ιών του έρπητα και του HIV (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011).

Η βιολογική δράση των ειδών Sideritis οφείλεται κυρίως στην παρουσία φαινολικών παραγώγων. Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν μία ευρύτατη κατηγορία φυσικών προϊόντων, με πλήθος δομών οι οποίες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την

ύπαρξη ενός βενζολικού δακτυλίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια ελεύθερα ή συνδεδεμένα (**Γράφημα 5**). Προκύπτουν από τα βιοσυνθετικά μονοπάτια του σικιμικού και του οξικού οξέος. Τα μονοπάτια αυτά συνδυάζονται σε κάποιες περιπτώσεις, ενώ σπανιότερα προστίθεται και το βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού (Παληογιάννη, 2007; Ozkan, 2009).



Γράφημα 5 Φαινολικός δακτύλιος

Στις φαινολικές ενώσεις έχει κατά καιρούς αποδοθεί ένας μεγάλος αριθμός φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Πιο γνωστή είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα πολλών φαινολικών παραγώγων και μπορεί να υποστηριχθεί ότι είναι η ιδιότητα που τα χαρακτηρίζει (Παληογιάννη, 2007). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών παραγώγων συνδέεται με την καταπολέμηση του οξειδωτικού stress, το οποίο είναι πιθανότατα το γενεσιουργό αίτιο πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Συγχρόνως, πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν, μεταξύ πολλών άλλων, αντιμικροβιακή, αντινεοπλασματική, αντιϊκή και προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην όλο και συχνότερη επιδίωξη της εισαγωγής φαινολικών ουσιών σε τρόφιμα.

Η βιολογική δράση του σιδερίτη είναι γνωστή από την αρχαιότητα, γεγονός που αναδεικνύεται από το πλήθος των αναφορών στις παραδοσιακές ιατρικές των χωρών στις οποίες ο σιδερίτης απαντάται ως αυτοφυούμενο είδος. Οι φαρμακολογικές δράσεις και η παραδοσιακή χρήση ορισμένων ειδών σιδερίτη συνοψίζονται στον Πίνακα 5, ενώ ορισμένες από τις κυριότερες βιολογικές δράσεις του σιδερίτη που υποστηρίζονται από τη σύγχρονη επιστημονική βιβλιογραφία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Είδος	Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακολογική δράση	Αναφορά	
Sideritis akmanii	-	εντομοκτόνο	Bondi et al. (2000)	
Sideritis albiflora	αντιμικροβιακό	αντιμικροβιακό	Sarac & Ugur (2007), Dulger <i>et</i> <i>al.</i> (2005α,β)	
Sideritis amasica	αφέψημα	αντιοξειδωτικό	Tunalier <i>et al.</i> (2004)	
Sideritis angustifolia	χωνευτικό, επουλωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιρρευματικό, αναλγητικό για πόνους εμμήνου ρύσης	αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες	Villar <i>et al.</i> (1986α,β), de las Heras <i>et al.</i> (2001)	
Sideritis arguta	καρύκευμα, διουρητικό, έναντι κοινού κρυολογήματος, νεφρίτιδας και φλεγμονών ουρήθρας	αντιοξειδωτικό	Güvenç <i>et al.</i> (2005), Ertas <i>et al.</i> (2009)	
Sideritis armeniaca	-	αντιοξειδωτικό	Tunalier <i>et al</i> . (2004)	
Sideritis bilgerana	-	αντιμικροβιακό	Dulger <i>et al.</i> (2006), Iscan <i>et al.</i> (2005)	
Sideritis brevibracteata	αντιμικροβιακό	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό	Dulger <i>et al</i> . (2005α,β), Güvenç <i>et al</i> . (2005)	
Sideritis brevidens	αφέψημα	αντιμικροβιακό	Dulger <i>et al.</i> $(2005\alpha,\beta)$	
Sideritis caesarea	γαστροπροστατευτικό, αφέψημα	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό, έναντι έλκους	Gürbüz <i>et al.</i> (2005), Sagdic <i>et al.</i> (2008)	
Sideritis canariensis var. pannosa	κυτταροστατικό, επουλωτικό, στυπτικό, αντιγριπικό, αντιμικροβιακό, διεγερτικό αγγείων / κυκλοφορικού	αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό	Hernandez-Perez & Rabanal (2002)	
Sideritis candicans var. eriocephala	-	αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό	Hernandez-Perez et al. (2004)	

Πίνακας 5 Φαρμακολογικές δράσεις και παραδοσιακές χρήσεις ειδών του γένους Sideritis (τροποποίηση από Gonzáles-Burgos et al., 2011).

Είδος	Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακολογική δράση	Αναφορά
Sideritis cilicica	αφέψημα	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό	Dulger <i>et al.</i> (2005α,β), Iscan <i>et al.</i> (2005), Tunalier <i>et al.</i> (2004)
Sideritis condensata	γρίπη, άγχος, πονόλαιμος	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό	Dulger <i>et al.</i> (2006), Özcan <i>et al.</i> (2001), Güvenç <i>et al.</i> (2005)
Sideritis curvidens	αντιμικροβιακό	αντιμικροβιακό	Uğur <i>et al.</i> (2005)
Sideritis dichotoma	-	μυκητοκτόνο	Dulger et al. (2006)
Sideritis erythrantha var. erythrantha	αφέψημα	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό	Özkan et al. (2005)
Sideritis euboea	αφέψημα	γαστροπροστατευτικό, αντιοξειδωτικό	Tsaknis & Lalas (2005)
Sideritis foetens	χωνευτικό, έναντι στομαχικών πόνων αντιφλεγμονώδες		de las Heras <i>et al.</i> (1999), Navarro <i>et al.</i> (2001)
Sideritis funkiana	χωνευτικό, γαστροπροστατευτικό	αντιμικροβιακό, έναντι έλκους	Villar <i>et al</i> . (1986α,β), Zarzuelo <i>et al</i> . (1993)
Sideritis funkiana ssp. funkiana	-	αντιφλεγμονώδες, έναντι έλκους	Zarzuelo et al. (1993)
Sideritis funkiana ssp. talaverana	-	αντιφλεγμονώδες	Zarzuelo et al. (1993)
Sideritis galatica	ενισχυτικό όρεξη, έναντι μετεωρισμού	μυκητοκτόνο	Dulger et al. (2006)
Sideritis germanicopolitana ssp. germanicopolitana	-	αντιοξειδωτικό	Tunalier et al. (2004)
Sideritis germanicopolitana ssp. viridis	-	αντιοξειδωτικό	Tunalier et al. (2004)
Sideritis granatensis	έναντι δερματοπαθειών, βήχα, έλκους, αντιαιμορροϊδικό, ηπατοπροστατευτικό, καθαρτικό, χωνευτικό, επουλωτικό	αντιμικροβιακό	Rodríguez-Linde et al. (1994)

Είδος	Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακολογική δράση	Αναφορά	
Sideritis hirsuta	χωνευτικό, διουρητικό, επουλωτικό, αντιπυρετικό, έναντι μετεωρισμού	αντιφλεγμονώδες	Zarzuelo et al. (1993)	
Sideritis huber-morathii	-	αντιοξειδωτικό	Tunalier <i>et al.</i> (2004)	
Sideritis incana var. virgata	χωνευτικό	αντιφλεγμονώδες, έναντι έλκους	Zarzuelo et al. (1993)	
Sideritis italica	επουλωτικό, έναντι έλκους	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό, έναντι έλκους	Basile et al. (2006)	
Sideritis javalambrensis	επουλωτικό	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες	Villar <i>et al.</i> (1986α,β), Rios <i>et al.</i> (1992), Godoy <i>et al.</i> (2000), de las Heras & Hoult (1994)	
Sideritis lanata	αντιμικροβιακό	αντιμικροβιακό	Uğur <i>et al.</i> (2005)	
Sideritis leptoclada	αποχρεμπτικό, έναντι κοινού κρυολογήματος	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό	Sarac and Ugur (2007), Güvenç <i>et al.</i> (2005)	
Sideritis leucantha	επουλωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιμικροβιακό, χωνευτικό	αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες, έναντι έλκους	Villar <i>et al.</i> (1986α,β), Alcaraz & Tordera (1988), Ferrándiz <i>et</i> <i>al.</i> (1990)	
Sideritis libanotica ssp. libanotica	αφέψημα	αντιοξειδωτικό	Güvenç et al. (2005)	
Sideritis libanotica ssp. linearis	αφέψημα	έναντι υπερπλασιών	Demirtas et al. (2009)	
Sideritis lotsyi ssp. mascaensis	-	αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό	Hernandez-Perez & Rabanal Gallego (2002)	
Sideritis lycia	έναντι κοινού κρυολογήματος, αναλγητικό άνω αναπνευστικής οδού	αντιφλεγμονώδες	Akços et al. (1999)	
Sideritis mugronensis	αντιφλεγμονώδες, αντιρρευματικό, χωνευτικό, γαστροπροστατευτικό	αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες	Villar <i>et al.</i> (1986α,β), Villar & Alcaraz (1984), Villar <i>et al.</i> (1984α,β) Villar <i>et al.</i> (1983),	

Είδος	Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακολογική δράση	Αναφορά
			Moroney <i>et al</i> . (1988), Ferrándiz <i>et al</i> . (1990)
Sideritis ozturkii	φαρμακευτικό αφέψημα, μπαχαρικό	αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό	Sagdic <i>et al.</i> (2008), Küpeli <i>et al.</i> (2007α,β)
Sideritis perfoliata ssp. perfoliata	αντιφλεγμονώδες, αντιρρευματικό, έναντι έλκους, χωνευτικό, αγγειοπροστατευτικό	αντιφλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό	Charami et al. (2008)
Sideritis phrygia	-	αντιοξειδωτικό	Güvenç et al. (2005)
Sideritis pisidica	αντιμικροβιακό, έναντι κοιλιακών πόνων	αντιμικροβιακό	Dulger <i>et al.</i> $(2005\alpha,\beta)$
Sideritis pusilla	έναντι έλκους και στομαχικών πόνων	αντιμικροβιακό	Díaz <i>et al</i> . (1988)
Sideritis pusilla ssp. flavovirens	-	αντιμικροβιακό	Rodríguez-Linde et al. (1994)
Sideritis raeseri ssp. raeseri	αφέψημα, αντιφλεγμονώδες, τονωτικό	αντιοξειδωτικό	Gabrieli et al. (2005)
Sideritis rubriflora	αφέψημα	μυκητοκτόνο, εντομοκτόνο	Dulger <i>et al.</i> (2006), Bondi <i>et al.</i> (2000)
Sideritis scardica	αντιφλεγμονώδες, χωνευτικό, διεγερτικό, έναντι κοινού κρυολογήματος, βρογχίτιδας και βρογχικού άσθματος	αντιμικροβιακό	Kostadinova et al. (2008)
Sideritis scardica ssp. scardica	έναντι βρογχίτιδας, βήχα, κρυολογήματος, γρίπης	αντιοξειδωτικό	Tunalier et al. (2004)
Sideritis serratifolia	αφέψημα	αντιοξειδωτικό	Güvenç <i>et al.</i> (2005), Tunalier <i>et al.</i> (2004)
Sideritis sipylea	αντιφλεγμονώδες,	αντιμικροβιακό,	Dulger et al. (2006), Aligiannis

Είδος	Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακολογική δράση	Αναφορά
	αντιρρευματικό, αντιμικροβιακό	αντιοξειδωτικό	<i>et al.</i> (2001), Güvenç <i>et al.</i> (2005)
Sideritis stricta	αφέψημα, τονωτικό όρεξης, έναντι μετεωρισμού, κοινού κρυολογήματος, προστατευτικό αναπνευστικού	αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό	Küpeli <i>et al</i> . (2007α,β)
Sideritis syriaca	τονωτικό, έναντι κοινού κρυολογήματος	αναλγητικό, αντιφλεγμονώδες	Menghini et al. (2005)
Sideritis syriaca ssp. syriaca	αντιφλεγμονώδες, αντιρρευματικό, αντιμικροβιακό, αφέψημα	αντιμικροβιακό	Aligiannis et al. (2001)
Sideritis taurica	-	αναλγητικό, αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, έναντι έλκους και υπεργλυκαιμίας	Tunalier <i>et al.</i> (2004), Aboutabl <i>et al.</i> (2002)
Sideritis tragoriganum	έναντι έλκους, γρίπης, αποχρεμπτικό, αδυνατιστικό, καθαρτικό, αναλγητικό άνω αναπνευστικής οδού, επουλωτικό, αντιφλεγμονώδες	αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες	Villar <i>et al.</i> (1986α,β), Bas <i>et al.</i> (2006)
Sideritis trojana	αφέψημα, έναντι έλκους και ασθενειών του αναπνευστικού	μυκητοκτόνο, εντομοκτόνο	Dulger <i>et al.</i> (2006), Aslan <i>et al.</i> (2006)

1.5.1. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων

Σε πειράματα που αφορούσαν στην αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου ελληνικών δειγμάτων σιδερίτη, εκτιμήθηκε η επίδρασή του στην ανάπτυξη των Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae και Pseudomonas aeruginosa (Gram-αρνητικά βακτήρια), Staphylococcus aureus και Staphylococcus epidermidis (Gram-θετικά βακτήρια), καθώς και των μυκήτων Candida albicans, Candida tropicalis και Torulopsis glabrata (Aligiannis et al., 2001). Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίστηκε μέσω της ελάχιστης συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) που προκαλεί παρεμπόδιση της ορατής ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες πρότυπα αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά, ενώ εξετάστηκε και η δράση των κυριότερων συστατικών του αιθερίου ελαίου (καρβακρόλη, α- και β-πινένιο).

Το αιθέριο έλαιο του Sideritis syriaca subsp. syriaca χαρακτηρίστηκε από την υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ το αιθέριο έλαιο του S. raeseri subsp. raeseri δε βρέθηκε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών (Πίνακας 6). Οι διαφορές μεταξύ των ειδών του σιδερίτη αποδίδονται στη σύσταση του αιθερίου ελαίου, με το S. syriaca subsp. syriaca να περιέχει καρβακρόλη σε ποσοστό 33,68%, ενώ το ολικό ποσοστό α-πινενίου και καρβακρόλης στο S. raeseri subsp. raeseri ήταν 4,48%. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την αντιμικροβιακή δράση που εμφάνισαν τα ισομερή του πινενίου και η καρβακρόλη, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η δράση του αιθερίου ελαίου του σιδερίτη έναντι της ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε α-πινένιο και κυρίως σε καρβακρόλη.

Η αντιμικροβιακή δράση αναφέρεται ότι διαφοροποιείται, επίσης, και σε σχέση με το φυτικό ιστό από τον οποίο έχει παραληφθεί το αιθέριο έλαιο. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το Sideritis italica βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα εμφανίζει υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με το αντίστοιχο των ταξιανθιών (Basile *et al.*, 2006).

Αντίστοιχα πειράματα έχουν αναδείξει την αντιμικροβιακή δράση και εκχυλισμάτων σιδερίτη. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των S. albiflora, S. brevibracteata και S. pisidica διαχωρίστηκαν με εκχύλιση σε σύστημα CHCl₃: H₂O, η υδατική φάση διαχωρίστηκε εκ νέου σε n-BuOH : H₂O και εκτιμήθηκε η παρεμποδιστική δράση του εκχυλίσματος και των κλασμάτων του έναντι της ανάπτυξης 13 βακτηρίων και μυκήτων (Dulger et al., 2005a). Το μεθανολικό εκχύλισμα και το κλάσμα του χλωροφορμίου και των τριών ειδών παρουσίασε ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση έναντι των περισσότερων μικροοργανισμών. Αντίστοιχη εικόνα παρουσίασε το κλάσμα της βουτανόλης των S. albiflora και S. brevibracteata, ενώ καμία παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών δεν παρουσίασε η υδατική φάση και των τριών ειδών.

	Gram-θετικά βακτήρια	Gram-αρνητικά βακτήρια	Μύκητες
S. clandestina subsp.	9,8-9,9	3,2-9,1	2,8-5,0
S. raeseri subsp. raeseri	-	-	-
S. raeseri subsp. attica	7,5-9,3	3,0-9,3	1,9-3,4
S. sipylea	6,8-7,5	2,8-8,8	1,8-3,5
S. syriaca subsp. syriaca	0,6-0,7	0,8-2,3	0,7-1,6
α-πινένιο	7,5-9,5	2,0-15,0	2,0-4,0
β-πινένιο	9,5-16,3	6,9->20,0	9,1-9,5
καρβακρόλη	<0,1	<0,1-1	0,4-1
αντιμυκητιακά	-	-	$0,1 \times 10^{-3} - 10 \times 10^{-3}$
αντιβιοτικά	$0,5x10^{-3}-4x10^{-3}$	$1 \times 10^{-3} - 10 \times 10^{-3}$	-

Πίνακας 6 Αντιμικροβιακή δράση (MIC σε mg/mL) των αιθερίων ελαίων ειδών σιδερίτη και των κύριων συστατικών τους (τροποποίηση από Aligiannis *et al.*, 2001).

Η υψηλή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων σιδερίτη αναφέρεται ότι συσχετίζεται θετικά με την αυξημένη συγκέντρωση διτερπενίων σε αυτά (Gonzáles-Burgos et al., 2011). Κατά τη μελέτη των διτερπενίων που απομονώθηκαν από το S. sipylea, η επικανδικανδιόλη παρεμπόδισε την ανάπτυξή των εξεταζόμενων βακτηρίων και μυκήτων, ενώ η λινεαρόλη και η σιδερόλη δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση (Loğoğlu et al., 2006). Οι ερευνητές αποδίδουν τη διαφοροποίηση αυτή στη δομή των ενώσεων (Γράφημα 6), συσχετίζοντας τη μειωμένη δράση έναντι της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με την παρουσία της ακέτυλο ομάδας στο μόριο της λινεαρόλης και της σιδερόλης.



Γράφημα 6 Δομές της λινεαρόλης, της σιδερόλης και της επικανδικανδιόλης.

1.5.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα είδη του γένους Sideritis αποτελούν σημαντική πηγή ενώσεων με αντιφλεγμονώδη δράση, με πλήθος επιστημονικών μελετών να επιβεβαιώνουν τη χρήση των φυτών του γένους αυτού ως αντιφλεγμονώδη (Gonzáles-Burgos *et al.*, 2011).

Διαφορετικά εκχυλίσματα και κλάσματα των υπέργειων τμημάτων των Sideritis canariensis var. pannosa και Sideritis candicans var. eriocephala εξετάστηκαν ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση τους, με το κλάσμα του χλωροφορμίου να παρουσιάζει την υψηλότερη δραστικότητα σε περιπτώσεις επαγόμενου οιδήματος σε πέλματα και αυτιά ποντικιών (Hernandez-Perez & Rabanal, 2002; Hernandez-Perez & Rabanal, 2002; Hernandez-Perez, Sanchez-Mateo, Montalbetti-Moreno, Rabanal, 2004).

Aξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση αναφέρεται, μεταξύ άλλων, για τα εκχυλίσματα σε εξάνιο και μεθανόλη του *Sideritis javalambrensis* (de las Heras, Vivas, Villar, 1994; Godoy, de las Heras, Vivas, Villar, 2000; Villena, Vivas, Villar, 2000), το ακετονικό εκχύλισμα του *Sideritis foetens* (Navarro, de las Heras, Villar, 2001) και το ακετονικό εκχύλισμα του *Sideritis ozturkii* (Küpeli, Şahin, Çaliş, Yeşilada, Ezer, 2007α; Küpeli, Şahin, Yeşilada, Çaliş, Ezer, 2007β).

1.5.3 Αντιελκογόνος δράση

Η προστατευτική δράση του αφεψήματος σιδερίτη έναντι της εμφάνισης έλκους εξετάστηκε σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια (Gürbüz, Özkan, Yesilada & Kutsal, 2005). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη στην παρεμπόδιση εμφάνισης συμπτωμάτων σε ποντίκια στα οποία επάχθηκε έλκος μέσω χορήγησης αιθανόλης. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η κυτταροπροστατευτική ουσία misoprostol και ποντίκια τα οποία δεν έλαβαν το εκχύλισμα ή το φάρμακο. Η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος βρέθηκε να είναι ίση με το 95,8% της αντίστοιχης της δραστικής misoprostol, ενώ το 50% των ποντικιών στο οποίο είχε χορηγηθεί σιδερίτης δεν εμφάνισε κανένα σύμπτωμα έλκους.

Οι Gonzáles-Burgos et al. (2011) αναφέρουν ότι σε πειράματα με ποντίκια στα οποία είχε επαχθεί έλκος μέσω χορήγησης ινδομεθακίνης και καταπόνησης υπό ψύχος και περιορισμό, τα υδατικά εκχυλίσματα σιδερίτη εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, με διαφοροποιήσεις μεταξύ των εξεταζόμενων φυτικών ειδών. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το αιθέριο έλαιο του Sideritis italica ανέδειξαν ότι ασκεί ισχυρή παρεμποδιστική δράση στην in vitro ανάπτυξη του Helicobacter pylori, το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση έλκους (Basile et al., 2006). Στην περίπτωση αυτή, το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα αναδείχτηκε περισσότερο δραστικό σε σύγκριση με αυτό των ταξιανθιών.

Η δραστικότητα των εκχυλισμάτων σιδερίτη στην πρόληψη και την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του έλκους αποδίδεται στη χημική τους σύσταση και κυρίως στα φλαβονοειδή που περιέχουν. Πειράματα ανέδειξαν ότι η χορήγηση του 8-Ο-γλυκοζίτη της υπολαετίνης, ο οποίος είχε απομονωθεί από το *Sideritis leucantha*, μείωσε σημαντικά τις γαστρικές αλλοιώσεις σε ασθενή ποντίκια (Alcaraz & Tordera, 1988).

1.5.4 Δράση ως εκλεκτικοί τροποποιητές οιστρογονικών υποδοχέων

Σε πειράματα που έγιναν με υδατικά εκχυλίσματα ελληνικών ειδών σιδερίτη (Sideritis euboea, Sideritis clandestina), διερευνήθηκε η επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστικών κυττάρων και καρκινικών σειρών (Kassi, Papoutsi, Fokialakis, Messari, Mitakou & Moutsatsou, 2004).

Τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστικών κυττάρων (KS483) και παρουσίασαν αντιοιστρογονική δράση στην κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού (MCF-7). Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκε

επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα καρκίνου του τραχήλου (HeLa). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η παρουσία οιστραδιόλης παρεμπόδισε την αντιοιστρογονική δράση του σιδερίτη στην κυτταρική σειρά MCF-7, αναδεικνύουν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα ως πιθανούς εκλεκτικούς τροποποποιητές οιστρογονικών υποδοχέων. Τα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τους ερευνητές, υποστηρίζουν την πιθανή αξιοποίηση των υδατικών εκχυλισμάτων των Sideritis euboea και Sideritis clandestina στο σχεδιασμό βιολειτουργικών τροφίμων για την πρόληψη της οστεοπόρωσης.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η διερεύνηση των φυτοχημικών ιδιοτήτων των ελληνικών ειδών του γένους *Sideritis* L. μπορεί να συμβάλλει στη μελέτη των ήδη γνωστών ειδών, αλλά και στην αξιοποίηση της ποικιλομορφίας που παρουσιάζει ο μεγάλος αριθμός αυτοφυών υποειδών, οικοτύπων και υβριδίων που απαντώνται στην Ελλάδα. Η περαιτέρω μελέτη της χημικής σύστασης του σιδερίτη μπορεί, επιπλέον, να υποστηρίξει επιστημονικά τις ιδιότητες που αποδίδονται στο φυτό από την παραδοσιακή ιατρική.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την ανάλυση και τη συγκριτική μελέτη του χημικού προφίλ (αιθέριο έλαιο, υδρομεθανολικά εκχυλίσματα) τριών ειδών σιδερίτη, των Sideritis scardica, Sideritis perfoliata και Sideritis raeseri.

Παράλληλα, η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να παράσχει πληροφορίες σχετικά με τις φαινοτυπικές διαφορές και την παραλλακτικότητα που παρουσιάζονται σε φυτά του ίδιου είδους. Η προσωπική εμπειρία του γράφοντος από την πολύχρονη ενασχόληση με την καλλιέργεια αρωματικών - φαρμακευτικών φυτών οδήγησε στην παρατήρηση ότι φυτά σιδερίτη που προέκυψαν από μητρικές φυτείες με εγγενή πολλαπλασιασμό παρουσίασαν, κατά περίπτωση, έντονη παραλλακτικότητα στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των θυγατρικών γενεών. Το πρόβλημα αυτό που εντοπίζεται στην καλλιεργητική πρακτική μπορεί να αντιμετωπιστεί με ανανέωση της φυτείας μέσω αγενούς πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, πριν την εφαρμογή του μέτρου αυτού, είναι αναγκαίο να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο η παρατηρηθείσα παραλλακτικότητα οφείλεται σε φυσιολογικές μορφολογικές διαφορές λόγω εγγενούς πολλαπλασιασμού ή εάν πρόκειται για ορισμένο ποσοστό υβριδισμού ή διασταύρωσης λόγω σταυρογονιμοποίησης μεταξύ των υποειδών. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε σκόπιμο να συμπεριληφθούν στην παρούσα μελέτη δύο διακριτά δείγματα Sideritis perfoliata, τα οποία αν και προέρχονταν από την ίδια μητρική φυτεία μέσω εγγενούς πολλαπλασιασμού, παρουσίασαν έντονη φαινοτυπική διαφοροποίηση.

Επιμέρους σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διαπιστωθεί εάν η παραλλακτικότητα μεταξύ των δύο προαναφερθέντων δειγμάτων Sideritis perfoliata αντικατοπτρίζεται και σε διακριτό χημικό προφίλ.

2. Πειραματικό μέρος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του Γ.Π.Α. κατά την περίοδο 2015-2016.

2.1 Φυτικό υλικό

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ελληνικοί καλλιεργούμενοι πληθυσμοί του γένους Sideritis και συγκεκριμένα: ένας (1) πληθυσμός S. raeseri, ένας (1) S. scardica και δύο (2) πληθυσμοί S.perfoliata (αναφέρονται εφεξής ως S.perfoliata A και S.perfoliata B). Η βοτανική ταξινόμηση των πληθυσμών αυτών έγινε από το Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γ.Π.Α.. Η επιλογή των δύο πληθυσμών S.perfoliata κρίθηκε σκόπιμη στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, καθώς, παρά την ταξινόμησή τους στο ίδιο είδος και το γεγονός ότι προέρχονταν από την ίδια μητρική φυτεία μέσω εγγενούς πολλαπλασιασμού, οι δύο πληθυσμοί παρουσίαζαν μακροσκοπικά μορφολογικές διαφορές και συγκεκριμένα:

- στο S.perfoliata Α τα στελέχη και τα φύλλα έφεραν λίγα τριχίδια και το χρώμα των φύλλων ήταν πρασινωπό
- στο S.perfoliata Β τα στελέχη και τα φύλλα έφεραν περισσότερα τριχίδια και το χρώμα των φύλλων ήταν γκρίζο.

Σύμφωνα με τους Strid & Tan (1991), οι διαφορές αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως πρόκειται για τα συγγενικά είδη *Sideritis perfoliata* ssp. *perfoliata* και *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, αντίστοιχα.

Το σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων προήλθε από καλλιεργούμενο αγρό στην περιοχή του Δομοκού Φθιώτιδας σε υψόμετρο 580 m (γ.π. 39,13 - γ.μ. 22,29). Στο σύνολο τους οι τέσσερις πληθυσμοί έλαβαν τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες Πρόκειται για καλλιέργεια δεύτερης χρονιάς, μη αρδευόμενη. Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε το πρώτο δεκαήμερο του Ιουνίου 2015 χειρωνακτικά. Η ξήρανση έγινε με φυσικό τρόπο υπό σκιά σε ανοξείδωτα τελάρα ξήρανσης σε συνθήκες περιβάλλοντος με θερμοκρασία 28-35°C σε αποθήκη κλειστού τύπου, ειδικά τροποποιημένη με θυρίδες εξαερισμού για σωστή ροή αέρα.

Στις εργαστηριακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν μόνο οι δρόγες των φυτών (τα φύλλα και οι ταξιανθίες) και να

απορριφθούν τα στελέχη, προκειμένου τα αποτελέσματα αναφορικά στα χημικά συστατικά να απεικονίζουν κατά το δυνατό ακριβέστερα το χημικό προφίλ του εμπορικά αξιοποιήσιμου τελικού προϊόντος των εξεταζόμενων φυτικών ειδών.

2.2 Παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών αιθερίου ελαίου

Το αιθέριο έλαιο των δρογών των τεσσάρων πληθυσμών του γένους *Sideritis* παραλήφθηκε με τη μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς (υδροαπόσταξη) σε συσκευή τύπου Clevenger (*Εικόνα* 1).



Εικόνα 1 Η πειραματική διάταξη τύπου Clevenger που χρησιμοποιήθηκε για την υδροαπόσταξη.

Συγκεκριμένα, κονιοποιημένο δείγμα (φύλλα και ταξιανθίες) ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και 250 g τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη 5 L με 3500 mL απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, η φιάλη συνδέθηκε με το κύριο σώμα της συσκευής, στο οποίο τοποθετήθηκε κατακόρυφος ψυκτήρας. Η ψύξη γινόταν με συνεχή ροή νερού βρύσης. Ακολούθησε θέρμανση της φιάλης με τη χρήση θερμομανδύα. Η απόσταξη, από την έναρξη του βρασμού ως την ολοκλήρωσή της, διήρκησε 3 ώρες. Αφού το σώμα της συσκευής Clevenger αφέθηκε να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος (περίπου μία ώρα), παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο. Σε αυτό προστέθηκε άνυδρο MgSO₄ για την απομάκρυνση της υγρασίας. Τέλος, το δείγμα αιθερίου ελαίου διηθήθηκε με φίλτρα PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-18°C).

Η χρωματογραφική ανάλυση των αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε σε αραιωμένα δείγματα 1/100 σε διαιθυλαιθέρα. Η ανάλυση των συστατικών του αιθέριου ελαίου έγινε με αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 5890 series II, συνδυασμένο με ανιχνευτή μαζών HP 5972 με ενέργεια ιονισμού 70 eV και άπολη τριχοειδή στήλη HP-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm πάχος υμενίου) (*Εικόνα* 2). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ροή 1 mL/min. Οι θερμοκρασίες εισόδου και ανιχνευτή ήταν 220°C και 290°C αντίστοιχα. Η ποσότητα του δείγματος ήταν 1 μL και η εισαγωγή στο σύστημα έγχυσης γινόταν χειροκίνητα με την τεχνική splitless. Αναφορικά στον προγραμματισμό της θερμοκρασίας της στήλης, έγινε σταδιακή αύξηση από τους 60°C στους 240°C όπου παρέμεινε για 10 min. Ο ρυθμός αύξησης ήταν 3°C/min και η ανάλυση είχε συνολική διάρκεια 70 min. Η ταυτοποίηση επιτεύχθηκε με τη σύγκριση του χρόνου συγκράτησης (retention time) και του φάσματος μάζας κάθε συστατικού με τα αντίστοιχα των βιβλιοθηκών φασμάτων της βιβλιογραφίας και του λογισμικού του οργάνου (Adams, NIST98, Wiley275).

Για κάθε έναν από τους τέσσερις εξεταζόμενους πληθυσμούς, έγιναν τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας παραλαβής και χρωματογραφικής ανάλυσης του αιθερίου ελαίου.



Εικόνα 2 Το σύστημα GC - MS που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αιθερίων ελαίων.

2.3 Παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μέσω της υδροαποστάξης

Το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από την υδροαπόσταξη προήλθε από το φυτικό υλικό όπως αυτό εκχυλίστηκε στο νερό καθ' όλη τη διάρκεια της απόσταξης (3 ώρες). Το υδατικό εκχύλισμα, μετά την παραλαβή του, διηθήθηκε με φίλτρο CA διαμέτρου πόρων 0,45 μm και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-18°C).

Η χρωματογραφική ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την υδροαπόσταξη έγινε με υγρό χρωματογράφο HPLC Agilent 1100 (*Εικόνα* 3), εξοπλισμένο με στήλη Supelco Discovery HS C18 (250 mm x 4,6 mm, *i.d.* 5 μm) θερμοστατούμενη στους 30°C. Η ποσότητα του δείγματος ήταν 20 μL και η εισαγωγή στο σύστημα έγχυσης γινόταν χειροκίνητα. Οι διαλύτες έκλουσης ήταν νερό με προσθήκη 0,25% φορμικού οξέος (A) και μεθανόλη (B). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλουση της στήλης ως εξής:

<i>t</i> (min)	A %	B %
0	25	75
2	25	75
40	90	10
45	90	10
50	25	75
60	25	75

Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV – Vis DAD, με ανίχνευση στα 260, 280 και 330 nm. Η επεξεργασία των χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών δεδομένων έγινε με το λογισμικό Chemstation της Agilent.



Εικόνα 3 Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων.

Για κάθε έναν από τους τέσσερις εξεταζόμενους πληθυσμούς, έγιναν τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας παραλαβής και χρωματογραφικής ανάλυσης του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε από την υδροαπόσταξη.

2.4 Συγκριτική μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους

Για την παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων των δρογών των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών του γένους *Sideritis*, αρχικά τα δείγματα κονιοποιήθηκαν και στη συνέχεια 1 g κονιοποιημένου δείγμα εκπλύθηκε με πετρελαϊκό αιθέρα b.p. 40-60 °C (10 mL x 2 εκχυλίσεις), προκειμένου να απομακρυνθούν λιπόφιλα συστατικά (π.χ. λιπίδια, ρητίνες και κηροί) τα οποία πιθανά να δυσχέραιναν την παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών όπως τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυάνες. Στη συνέχεια, το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε σε 20 mL συστήματος μεθανόλης : νερού (70:30) καθαρότητας HPLC, εντός λουτρού υπερήχων (*Εικόνα* 4), για 10 min. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz και η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-18°C).



Εικόνα 4 Η συσκευή του λουτρού υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.

Η χρωματογραφική ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων έγινε με χρήση της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC που περιγράφηκε για τα υδατικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την υδροαπόσταξη (Κεφάλαιο 2.3).

Για κάθε έναν από τους τέσσερις εξεταζόμενους πληθυσμούς, έγιναν τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας παραλαβής και χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων.

Στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα εφαρμόστηκε όξινη υδρόλυση προκειμένου να απομακρυνθούν τα σάκχαρα από τα μόρια των γλυκοζιτών. Συγκεκριμένα, μέρος του αρχικού υδροαλκοολικού εκχυλίσματος συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) (*Εικόνα* 5).



Εικόνα 5 Ο περιστροφικός εξατμιστήρας (rotary evaporator) που χρησιμοποιήθηκε.

Το στερεό ανακτήθηκε με υδατικό διάλυμα HCl 50% και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα σε εκχυλιστική χοάνη (δύο εκχυλίσεις με το συνολικό όγκο του οξικού αιθυλεστέρα να είναι ίσος με τον αρχικό όγκο του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος). Η υδατική φάση απορρίφθηκε και η φάση του οξικού αιθυλεστέρα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Η ανάκτηση έγινε σε μεθανόλη (στο μισό όγκο από αυτόν του αρχικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε για την όξινη υδρόλυση). Το μεθανολικό εκχύλισμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,20 μm και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-18°C).

Η χρωματογραφική ανάλυση των υδρολυμένων εκχυλισμάτων έγινε με χρήση της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC που περιγράφηκε για τα υδατικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την υδροαπόσταξη (Κεφάλαιο 2.3).

Για κάθε έναν από τους τέσσερις εξεταζόμενους πληθυσμούς, έγιναν τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας παραλαβής και χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC των υδρολυμένων εκχυλισμάτων.

Παράλληλα, τόσο τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ως είχαν, όσο και αυτά που προέκυψαν μετά την όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με χρήση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών. Για την ανάλυση ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Santana-Meridas *et al.* (2014). Συγκεκριμένα, τα υδατικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν βάσει της τεχνικής LC–MS (ESI) σε υγρό χρωματογράφο συνδυασμένο με φασματόμετρο μάζων Shimadzu LC/MS-2010A (*Εικόνα* 6).



Εικόνα 6 Το σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A

Το όργανο αποτελούνταν από δυαδική αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp, ανιχνευτή DAD SPD-M10Avp και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI, negative

mode). Χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με HPLC, με ροή 0.4 mL/min. Η κινητή φάση και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ήταν όπως περιγράφηκε για την ανάλυση με HPLC. Ο όγκος του δείγματος που εισήχθη στο σύστημα ήταν 20 μL και η ανίχνευση UV έγινε στα 300 nm. Οι συνθήκες κατά την ανάλυση ήταν οι εξής: δυναμικό περιοχής εκνέφωσης -3.50 kV, τάση CDL (Curved Dissolvation Line) -20.0 V, θερμοκρασία CDL 250 C, τάση ανιχνευτή 1.48 kV. ροή αερίου εκνέφωσης 1,5 L/min και θερμοκρασία heat block 300 °C. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μαζών έγινε με το λογισμικό του οργάνου (Lab Solutions 3.40.307 της Shimadzu). Τα συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη βάσει των φασμάτων μαζών και των φασμάτων UV που παρουσίασαν, καθώς και μέσω της σύγκρισης των χρόνων έκλουσης με βιβλιογραφικά δεδομένα.

2.5 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, καταγράφηκαν φάσματα FT-IR από το αρχικό φυτικό υλικό, το φυτικό υλικό μετά την υδροαπόσταξη (Κεφάλαιο 2.2), το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από την υδροαπόσταξη (Κεφάλαιο 2.3), καθώς και από τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ως είχαν, αλλά και μετά την όξινη υδρόλυση (Κεφάλαιο 2.4). Για κάθε τύπο δείγματος επιλέχθηκε κατάλληλη τεχνική καταγραφής του φάσματος FT-IR και συγκεκριμένα, τα φάσματα που αντιστοιχούσαν στα υδατικά και υδροαλκοολικά εκχυλίσματα καταγράφηκαν με την τεχνική DRIFTS και τα φάσματα που αντιστοιχούσαν στα υδατικά και υδροαλκοολικά εκχυλίσματα καταγράφηκαν με την τεχνική ATR.

Η καταγραφή του συνόλου των φασμάτων έγινε σε φασματόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700 (*Εικόνα* 7).

Για την καταγραφή του φάσματος FT-IR των δειγμάτων φυτικού υλικού με χρήση της τεχνικής DRIFTS, το κονιοποιημένο, σε κάθε περίπτωση, φυτικό υλικό ξηράνθηκε και στη συνέχεια κοσκινίστηκε, ώστε να ληφθεί μία ομοιόμορφη και λεπτόκοκκη πούδρα, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR των αντίστοιχων δειγμάτων. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη του φάσματος του υποβάθρου (background) με βρωμιούχο κάλιο (KBr), έτσι ώστε να περιοριστούν οι απορροφήσεις που οφείλονταν κυρίως στο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και την υγρασία του περιβάλλοντος. Το κάθε φάσμα καταγράφηκε στην περιοχή 4000-400 cm⁻¹, μετά την τοποθέτηση του δείγματος στον κατάλληλο υποδοχέα και προέκυψε ως αποτέλεσμα 100 σαρώσεων, με την ανάλυση του οργάνου να ισούται με 4 cm⁻¹.



Εικόνα 7 Το όργανο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων.

Η καταγραφή του φάσματος FT-IR των υδατικών και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων (αρχικών και μετά από όξινη υδρόλυση) με χρήση της τεχνικής ATR πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας 0,7 mL του υδατικού εκχυλίσματος στον υποδοχέα του δείγματος, φροντίζοντας το υγρό να δημιουργήσει μια στοιβάδα ομοιόμορφου πάχους σε όλη την επιφάνεια του κρυστάλλου ZnSe του υποδοχέα. Η φύση των διαλυμάτων δεν επέτρεπε την απευθείας καταγραφή του φάσματος FT-IR, καθώς η παρουσία του νερού είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας πλατιάς κορυφής στην περιοχή 3400-2400 cm⁻¹ η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του υδροξυλίου (Stuart, 2004) και η οποία προκαλούσε αλλοιώσεις και υποβάθμιση της φασματικής πληροφορίας του συνόλου του φάσματος. Για το λόγο αυτό, πριν την καταγραφή του φάσματος, το εκχύλισμα αφέθηκε να ξηρανθεί, σχηματίζοντας μια λεπτή μεμβράνη πάνω στον κρύσταλλο του υποδοχέα. Η ξήρανση έγινε σε ήπια θερμοκρασία (~40°C) και χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως. Το φάσμα καταγράφηκε στην περιοχή 4000-650 cm⁻¹, προέκυψε από 100 σαρώσεις, με την ανάλυση του οργάνου να είναι 4 cm⁻¹.

Η καταγραφή και επεξεργασία του συνόλου των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3 της Thermo Fisher Scientific Inc. Η επεξεργασία των φασμάτων περιλάμβανε την εφαρμογή, στο σύνολο των φασμάτων, των αυτοματοποιημένων διεργασιών της εξομάλυνσης (automatic smooth) και της διόρθωσης της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) των φασμάτων. Επιπλέον, από το σύνολο των φασμάτων, αφαιρέθηκε η κορυφή του CO₂ (~2385-

2285 cm⁻¹), η οποία οφείλεται σε μεταβολές του ατμοσφαιρικού CO_2 κατά την καταγραφή των φασμάτων.

Για κάθε δείγμα που εξετάστηκε, καταγράφηκαν τρία φάσματα. Τα φάσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του μέσου φάσματος. Η αντιπροσωπευτικότητα του μέσου φάσματος ελέγχθηκε με τη σύγκριση κάθε φάσματος της τριπλέτας με αυτό και στη συνέχεια, το μέσο φάσμα χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά για τον έλεγχο της συσχέτισης των αντίστοιχων φασμάτων των υπολοίπων πληθυσμών με αυτό. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες οι οποίες περιείχαν τα μέσα φάσματα και με τη βοήθεια του λογισμικού υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης (correlation match values). Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

2.6 Χημειομετρική επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

Σε ότι αφορά στις συγκρίσεις μέσων και για τις περιπτώσεις όπου πληρούνταν οι προϋποθέσεις της ανάλυση της διασποράς (ANOVA), αυτή έγινε με τη γενική δοκιμασία F σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05 και οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων έγιναν με τη δοκιμασία Student's t.

Στο πλαίσιο των πολυμεταβλητών αναλύσεων, τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis) και τη μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων (Cluster Analysis).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού JMP 8.0.2 της SAS Institute Inc.(2008).

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 Συγκριτική μελέτη του αιθερίου ελαίου

3.1.1 Απόδοση σε αιθέριο έλαιο

Η μέση απόδοση (mL/100g ξερού φυτικού υλικού) των τεσσάρων αναλυθέντων πληθυσμών σιδερίτη σε αιθέριο έλαιο παρουσιάζεται στο **Γράφημα 7**. Το σύνολο των πληθυσμών παρουσιάζει πολύ χαμηλή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, με τα Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B, ωστόσο, να εμφανίζουν σχεδόν διπλάσιες αποδόσεις από τα Sideritis scardica και Sideritis raeseri.





Η χαμηλή απόδοση σε αιθέριο έλαιο των εξεταζόμενων πληθυσμών έρχεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στο γένος Sideritis. Συγκεκριμένα, οι Aligiannis et al. (2001), κατά τη μελέτη ελληνικών δειγμάτων σιδερίτη, αναφέρουν αντίστοιχες αποδόσεις για το S. raeseri subsp. raeseri (0,12%), ενώ υψηλότερη απόδοση αναφέρεται ότι παρουσίασε το S. raeseri subsp. attica

(0,37%). Σε ότι αφορά στην απόδοση των δύο πληθυσμών Sideritis perfoliata, η πειραματική εικόνα είναι συγκρίσιμη με αυτή που αναφέρεται από τους Kirimer et al. (2004) και αφορά σε φυτικό υλικό από την Τουρκία. Ωστόσο, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο του S. scardica subsp. scardica από την Τουρκία βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 0,02 - 0,04 % (Kirimer et al., 2004), τιμή κατά πολύ χαμηλότερη της αντίστοιχης του δείγματος που αναλύθηκε στην παρούσα εργασία. Παρόλο που η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο μεταβάλλεται συναρτήσει μίας πληθώρας παραγόντων, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθούν περισσότερα ελληνικά δείγματα Sideritis scardica προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υφίσταται γεωγραφική διαφοροποίηση της περιεκτικότητας σε αιθέριο έλαιο εντός του συγκεκριμένου είδους.

3.1.2 Σύσταση του αιθερίου ελαίου

Ο Πίνακας 7 παρουσιάζει τη σύσταση (%) των αιθερίων ελαίων των τεσσάρων διαφορετικών δειγμάτων σιδερίτη, όπως αυτή προέκυψε από την ανάλυση με GC-MS. Τυπικά χρωματογραφήματα για τα αιθέρια έλαια των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών δίνονται στα Γραφήματα Π1 - Π4 του Παραρτήματος, ενώ οι δομές των συστατικών των αιθερίων ελαίων παρουσιάζονται στα Γραφήματα Π5 και Π6 του Παραρτήματος.

Σε ότι αφορά στη σύσταση του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata A, κυρίαρχες ομάδες ενώσεων βρέθηκαν να είναι οι μονοτερπενικοί και σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες, με τα ποσοστά των δύο να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Υψηλότερη αφθονία παρουσίασε το α-πινένιο (14,0% ± 3,0), ακολουθούμενο από το cis-καλαμενένιο (13,0% ± 5,0) και το γ-γουργουνένιο (11,2% ± 0,5).

Κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata B ήταν τα μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια, όπως το Z-καρυοφυλλένιο (9,0% ± 1,0), το cisκαλαμενένιο (9,0% ±2,0) και το δικυκλογερμακρένιο (7,0% ± 3,0).

Τα αποτελέσματα που αφορούν στους δύο πληθυσμούς *S. perfoliata* διαφοροποιούνται από τα αντίστοιχα των Loizzo, Tundis, Menichini, Saab, Statti & Menichini (2007), οι οποίοι αναφέρουν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του *S. perfoliata* το φελλανδρένιο (B) σε ποσοστό περίπου 33%, ακολουθούμενο από το σαμπινένιο (~13%). Η απόκλιση αυτή μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι ερευνητές αυτοί χρησιμοποίησαν φυτικό υλικό από το Λίβανο, δεδομένου ότι η γεωγραφική προέλευση επηρεάζει σημαντικά το προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση ανέδειξε την απουσία δεδομένων αναφορικά στο αιθέριο έλαιο ελληνικών δειγμάτων *S. perfoliata*.

	t _R	Ενώσεις	S. perfoliata A (%)	S. perfoliata B (%)	S. scardica (%)	S. raeseri (%)
1	7,98	α-πινένιο	14,0±3,0 a	7,0±3,0 b	1,3±0,5 c	10,0±2,0 ab
2	9,47	β-πινένιο	2,7±0,4 b	5,0±1,0 b	2,6±0,4 b	15,0±5,0 a
3	9,88	μυρκένιο	1,6±0,3	-	-	-
4	10,47	φελλανδρένιο (Α)	$0,7\pm0,1$	-	-	-
5	11,01	δ-2-καρένιο	9,0±2,0	5,0±2,0	-	-
6	11,27	ο-κυμένιο	5,0±2,0	3,5±0,4	-	-
7	11,49	λιμονένιο	$4,2\pm0,4$	5,1±0,2	0,4±0,1	-
8	12,75	γ-τερπινένιο	3,9±0,9	2,7±0,3	-	-
9	18,12	τερπινεν-4-όλη	$1,1\pm0,4$	$1,06\pm0,07$	-	-
10	18,72	α-τερπινεόλη	$1,07\pm0,09$	$0,90\pm0,09$	-	-
11	26,17	α-κουμπεμπένιο	$0,5\pm0,2$	-	-	-
12	27,42	α-κοπαένιο	3,0±1,0	2,9±0,4	-	-
13	28,06	β-ελεμένιο	$0,7{\pm}0,1$	-	-	-
14	28,93	α-γουργουνένιο	$0,40\pm0,02$	-	-	-
15	29,41	Ζ-καρυοφυλλένιο	5,0±2,0	9,0±1,0	-	16,0±9,0
16	30,95	β-Ε-φαρνεσένιο	-	3,0±2,0	-	2,0±1,0
17	31,66	trans-καδινα-1 (6),4-διένιο	$0,7\pm0,4$	-	-	-
18	32,03	γερμακρένιο D	1,4±0,4 a	3,0±2,0 a	0,52±0,05 a	2,0±1,0 a
19	32,72	δικυκλογερμακρένιο	4,1±0,7 b	7,0±3,0 b	0,96±0,09 b	13,0±4,0 a
20	33,74	καδινένιο D	-	-	0,26±0,07	6,0±4,0
21	33,86	cis-καλαμενένιο	13,0±5,0	9,0±2,0	-	-
22	34,21	trans-καδινα-1,4-διένιο	4,0±2,0	2,0±1,0	-	-
23	34,87	εδικαρυόλη	$2,4\pm0,9$	-	-	-

Πίνακας 7 Σύσταση (%) των αιθερίων ελαίων των αναλυθέντων δειγμάτων σιδερίτη και χρόνοι έκλουσης (t_R) των συστατικών.

	t _R	Ενώσεις	S. perfoliata A (%)	S. perfoliata B (%)	S. scardica (%)	S. raeseri (%)
24	36,71	γ-γουργουνένιο	11,2±0,5	5,0±2,0	-	5,0±2,0
25	37,24	πρεμνασπειροδιένιο	0,9±0,1	4,0±1,0	-	-
26	38,63	γ-μουουρολένιο	1,1±0,3	-	-	-
27	38,69	κουπρενένιο Α	-	4,0±1,0	-	-
28	39,81	βαλερανόνη	-	-	-	1,8±0,3
29	40,14	β-μπισαμπολένιο	1,2±0,6	-	0,42±0,02	4,0±2,0
30	40,32	ιταλικένιο	-	2,0±0,3	1,60±0,04	-
31	41,24	δεκατετρανάλη	-	-	0,39±0,07	-
32	47,34	<i>n</i> -δεκαπεντανόλη	-	-	0,78±0,02	-
33	47,62	Ε,Ε-λιναλοολικό γερανύλιο	-	-	0,90±0,05	-
34	48,10	2-δεκαπεντανόνη	-	-	1,33±0,05	-
35	51,20	δεκανοϊκό οξύ	-	-	13,0±2,0	-
36	51,67	καουρ-15-ένιο	-	-	2,29±0,04	-
37	52,30	μανοολοξείδιο	-	-	0,65±0,03	-
38	53,37	2Ε-οξικό δωδεκακενύλιο	-	-	34,0±4,0	-
39	54,27	<i>n</i> -δεκαεξανόλη	-	-	0,81±0,05	-
40	55,90	Ε,Ζ-λιναλοολικό γερανύλιο	-	-	2,51±0,02	-
41	56,10	λινελαϊκός μεθυλεστέρας	-	-	2,7±0,4	-
42	58,30	νεο-αμπιετόλη	-	_	1,60±0,02	-

Μέσες τιμές της ίδιας γραμμής που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Τα μη οξυγονούχα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια παρουσιάστηκαν ως κυρίαρχα συστατικά και στο αιθέριο έλαιο του *Sideritis raeseri*. Τα σεκσιτερπένια ήταν περισσότερα σε αριθμό με κύρια το *Z*-καρυοφυλλένιο (16,0% ± 9,0) και το δικυκλογερμακρένιο (13,0% ± 4,0), ενώ αντίθετα ταυτοποιήθηκαν μόνο δύο μονοτερπένια, τα α- και β-πινένιο, τα οποία όμως συμμετέχουν στη σύσταση του αιθερίου ελαίου κατά 18-32%. Υψηλά ποσοστά δικυκλογερμακρένιου αναφέρονται και στην περίπτωση του αιθερίου ελαίου φυτικών δειγμάτων από τη Σερβία (Pljevljakušić *et al.*, 2011).

Τέλος, σε ότι αφορά στη σύσταση του αιθερίου ελαίου του Sideritis scardica, αυτή παρουσίασε διακριτή εικόνα από τους υπόλοιπους τρεις πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου ήταν το 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο (34,0% ± 4,0), ακολουθούμενο από το δεκανοϊκό οξύ (13,0% ± 2,0), ενώ τα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια που ταυτοποιήθηκαν παρουσίασαν χαμηλά ποσοστά. Η βιβλιογραφία και στην περίπτωση του Sideritis scardica δεν περιλαμβάνει δεδομένα που να αφορούν στη σύσταση του αιθερίου ελαίου ελληνικών δειγμάτων.

Για τα συστατικά των αιθερίων ελαίων για τα οποία πληρούνταν οι προϋποθέσεις της ANOVA, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων βάσει της δοκιμασίας Student's t (*Πίνακας 7*). Συγκεκριμένα:

- το Sideritis raeseri βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό *α*-πινενίου από τους τρεις άλλους πληθυσμούς, ενώ το Sideritis perfoliata A υπερείχε ως προς το ποσοστό του α-πινενίου και έναντι του Sideritis perfoliata B.
- το Sideritis raeseri βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά
 β-πινενίου και δικυκλογερμακρένιου από τους τρεις άλλους πληθυσμούς.

Από την ανάλυση των αιθερίων ελαίων προέκυψαν ουσίες που παρατηρήθηκαν σε ένα μόνο είδος ή και πληθυσμό και απουσίαζαν από τους υπόλοιπους. Κρίνεται σκόπιμο να αναλυθούν περισσότερα δείγματα και να συγκριθούν περαιτέρω με άλλα είδη του γένους, προκειμένου να διερευνηθεί το εάν και κατά πόσο οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως χημειοταξινομικοί δείκτες. Τέτοιες ουσίες ήταν:

- το μυρκένιο, το φελλανδρένιο (Α), το α-κουμπεμπένιο, το β-ελεμένιο, το α-γουργουνένιο, το trans-καδινα-1 (6),4-διένιο, η εδικαρυόλη, το γ-μουουρολένιο. Οι ουσίες αυτές ταυτοποιήθηκαν μόνο στο αιθέριο έλαιο του Sideritis perfoliata Α.
- το κουπρενένιο Α, το οποίο ταυτοποιήθηκε μόνο στο Sideritis perfoliata B.
- η βαλερανόνη, ουσία που ταυτοποιήθηκε μόνο στο Sideritis raeseri.
- η δεκατετρανάλη, η *n*-δεκαπεντανόλη, το *E*,*E*-λιναλοολικό γερανύλιο, η 2δεκαπεντανόνη, το δεκανοϊκό οξύ, το καουρ-15-ένιο, το μανοολοξείδιο, το 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο, η *n*-δεκαεξανόλη, το *E*,*Z*-λιναλοολικό γερανύλιο,
ο **λινελαϊκός μεθυλεστέρας** και η **νεο-αμπιετόλη**. Οι ουσίες αυτές ταυτοποιήθηκαν μόνο στο αιθέριο έλαιο του *Sideritis scardica*.

- το δ-2-καρένιο, το ο-κυμένιο, το γ-τερπινένιο, η τερπινεν-4-όλη, η ατερπινεόλη, το α-κοπαένιο, το cis-καλαμενένιο, το trans-καδινα-1,4-διένιο και το πρεμνασπειροδιένιο. Οι ουσίες αυτές ταυτοποιήθηκαν μόνο στους δύο πληθυσμούς Sideritis perfoliata.
- το β-Ε-φαρνεσένιο, το οποίο ταυτοποιήθηκε μόνο στο αιθέριο έλαιο των Sideritis perfoliata A και Sideritis raeseri.
- το **ιταλικένιο**, το οποίο ταυτοποιήθηκε μόνο στο αιθέριο έλαιο των Sideritis perfoliata B και Sideritis scardica
- το καδινένιο D, το οποίο απουσίαζε από το αιθέριο έλαιο των δύο πληθυσμών Sideritis perfoliata.
- το β-μπισαμπολένιο, το οποίο απουσίαζε από το αιθέριο έλαιο του Sideritis perfoliata B.
- το λιμονένιο, το οποίο απουσίαζε από το αιθέριο έλαιο του Sideritis raeseri.
- το Ζ-καρυοφυλλένιο και το γ-γουργουνένιο, ουσίες που απουσίαζαν από το αιθέριο έλαιο του Sideritis scardica.

3.2 Συγκριτική μελέτη υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Τυπικά χρωματογραφήματα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη που προέκυψαν μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους παρουσιάζονται στα *Γραφήματα 8 - 11*, ενώ η συγκριτική χρωματογραφική εικόνα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων δίνεται στο *Γράφημα Π 7* του Παραρτήματος.

Στο αρχικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα κάθε πληθυσμού εφαρμόστηκε όξινη υδρόλυση με σκοπό την απομάκρυνση των σακχάρων από τα μόρια των γλυκοζιτών. Η συγκριτική χρωματογραφική εικόνα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων μετά την όξινη υδρόλυση δίνεται στο *Γράφημα Π 8* του Παραρτήματος. Από τη συγκριτική εικόνα μεταξύ του αρχικού και του υδρολυμένου υδροαλκοολικού εκχυλίσματος (*Γραφήματα Π 9 - Π 12* του Παραρτήματος), προκύπτει ότι με τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης μειώθηκε σημαντικά η συγκέντρωση των ενώσεων που βρίσκονταν αρχικά σε γλυκοζιτική μορφή. Ωστόσο, το γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν και στα υδρολυμένα εκχυλίσματα αναδεικνύει ότι η υδρόλυση δεν ήταν πλήρης.



Γράφημα 8 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Sideritis perfoliata* A.



Γράφημα 9 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Sideritis perfoliata* B.



Γράφημα 10 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis scardica.



Γράφημα 11 Τυπικό χρωματογράφημα LC του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Sideritis raeseri*.

Για την ταυτοποίηση των συστατικών των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, αρχικά επιλέχθηκε το σύνολο των ενώσεων που ανιχνεύτηκε στα εκχυλίσματα σε ποσοστό $\geq 0,5\%$. Μεταξύ των ενώσεων αυτών και δεδομένης της έλλειψης πρότυπων ουσιών, η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με επιφύλαξη, συγκρίνοντας τα φάσματα UV και τα φάσματα μαζών με βιβλιογραφικά δεδομένα (Gabrieli *et al.*, 2005; Petreska *et al.*, 2011; Pljevljakušić. *et al.*, 2011; Stanoeva, Bagashovska & Stefova, 2012; Vasilopoulou *et al.*, 2013).

Ο Πίνακας 8 παρουσιάζει τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη στα αρχικά υδροαλκοολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη. Βάσει των διαθέσιμων βιβλιογραφικών δεδομένων, δεν κατέστη δυνατή η με επιφύλαξη ταυτοποίηση συστατικών των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων μετά την όξινη υδρόλυσή τους.

Πίνακας 8 Συστατικά των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη που ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων.

	Συστατικά	[M- H] ⁻ (m/z)	t _R (min)	S. perfoliata A (%)	S. perfoliata B (%)	S. scardica (%)	S. raeseri (%)
1	Παράγωγο υδροκιναμικού οξέος	191	17,75	7,99	8,84	1,99	4,60
2	Παράγωγο υδροκιναμικού οξέος	191	17,81	8,22	-	2,05	4,84
3	Φορσυθοζίτης (γλυκοζίτης φαινυλαιθανοειδούς)	755	25,34	3,00	3,85	6,91	5,44
4	Βερμπασκοζίτης (γλυκοζίτης φαινυλαιθανοειδούς)	623	28,94	20,09	17,80	9,89	13,19
5	7-Ο-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της λουτεολίνης (7-Ο-διγλυκοζίτης φλαβονοειδούς)	609	29,23	0,63	1,49	4,30	1,43
6	7-O-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της υπολαετίνης (ακετυλογλυκοζίτης φλαβονοειδούς)	667	29,9	2,57	2,81	5,91	2,25
7	7-O-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης (ακετυλογλυκοζίτης φλαβονοειδούς)	651	32,58	32,80	15,81	23,39	21,59
8	 7-O-[6΄΄΄-O-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της 3΄-O-μεθυλοϋπολαετίνης (ακετυλογλυκοζίτης φλαβονοειδούς) 	681	32,75	-	3,79	9,65	8,71
9	 7-O-[6΄΄΄-O-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της 4΄-O-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης (ακετυλογλυκοζίτης φλαβονοειδούς) 	665	38,01	3,79	19,45	0,68	6,48
10	7-O-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2)-[6"-Ο-ακετυλο]- γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης (ακετυλογλυκοζίτης φλαβονοειδούς)	693	38,74	-	0,72	11,34	9,24

Οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες (Πίνακας 8). Πρόκειται για παράγωγα υδροκιναμικού οξέος, γλυκοζίτες φαινυλαιθανοειδών, ένα διγλυκοζίτη φλαβονοειδούς και ακετυλογλυκοζίτες φλαβονοειδών. Τα φάσματα UV και τα φάσματα μαζών των κύριων σε κάποιο από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα συστατικών δίνονται στο Παράρτημα (Γραφήματα Π 13 - Π 15).

Στο αρχικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Sideritis perfoliata A ανιχνεύθηκαν 17 ουσίες με ποσοστό μεγαλύτερο του 0,5%, από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη οι οκτώ. Κύριο συστατικό ήταν ο 7-Ο-[6^{'''}-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης με ποσοστό 32,80%, ακολουθούμενος από το βερμπασκοζίτη (20,09%).

Στο υδροαλκοολικό εκχύλισμα του Sideritis perfoliata B ανιχνεύθηκαν 23 ουσίες με ποσοστό μεγαλύτερο του 0,5%, από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη οι εννιά. Κύριο συστατικό στην περίπτωση αυτή ήταν ο 7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της 4΄-Ο-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης (19,45%). Οι δύο ενώσεις που αποτελούσαν τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος του Sideritis perfoliata A, ανιχνεύθηκαν και στο εκχύλισμα του Sideritis perfoliata B σε σχετικά υψηλά ποσοστά (βερμπασκοζίτης 17,80%, 7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της 15,81%).

Στο μη υδρολυμένο υδροαλκοολικό εκχύλισμα του Sideritis scardica ανιχνεύθηκαν 22 ουσίες με ποσοστό μεγαλύτερο του 0,5%, από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη οι δέκα. Κύριο συστατικό ήταν ο 7-Ο-[6''-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης με ποσοστό 23,39%, ακολουθούμενος από τον 7-Ο-[6'''-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2)-[6"-Ο-ακετυλο]-γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης (11,34%) και το βερμπασκοζίτη (9,89%).

Τέλος, στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Sideritis raeseri ανιχνεύθηκαν 24 ουσίες με ποσοστό μεγαλύτερο του 0,5%, από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν με επιφύλαξη οι δέκα. Το εκχύλισμα του Sideritis raeseri παρουσίασε όμοια εικόνα με το αντίστοιχο του Sideritis perfoliata A, με κύριο συστατικό τον 7-O-[6^{''}-O-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης με ποσοστό 21,59%, ακολουθούμενο από το βερμπασκοζίτη (13,19%).

3.3 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπίας FT-IR

3.3.1 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT-IR – μέθοδος DRIFTS στο φυτικό υλικό πριν και μετά την υδροαπόσταξη

Τα φάσματα των δρογών των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη καταγράφηκαν, με χρήση της τεχνικής DRIFTS, τόσο από το αρχικό φυτικό υλικό, όσο και από πού προέκυψε μετά από ξήρανση ποσότητας δείγματος που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί στην υδροαπόσταξη. Τυπικά φάσματα FT-IR των τεσσάρων πληθυσμών παρουσιάζονται στη συνέχεια (Γράφημα 12 - Γράφημα 15).

Ένα φάσμα FT-IR διακρίνεται από δύο περιοχές: 1) των χαρακτηριστικών ομάδων (4000 - 1500 cm^{-1}) και 2) του δακτυλικού αποτυπώματος ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$).

Σύμφωνα με τους Vivekanand, Chawade, Larsson, Larsson, & Olsson (2014), η πλατιά κορυφή στα ~3400 cm⁻¹, αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων υδροξυλίου σε αλειφατικές και φαινολικές δομές (δόνηση τάσης –OH).

Η απορρόφηση στη περιοχή 2920 - 2940 cm⁻¹ αποδίδεται, σύμφωνα με τους Kouvoutsakis, Mitsi, Tarantilis, Polissiou & Pappas (2014), στη δόνηση τάσης του C-H, ενώ αυτή της περιοχής 1742 - 1739 cm⁻¹ σχετίζεται με τη δόνηση τάσης του C=O των εστέρων.

Αναφέρεται, επίσης, ότι οι αλκυλεστέρες πηκτινών εντοπίζονται σε ζώνες απορρόφησης κοντά στα 1740 cm⁻¹ (Pappas, Tarantilis & Polissiou, 1998).

Όσον αφορά στην απορρόφηση στα ~1650 cm⁻¹, αυτή αποδίδεται στη δόνηση κάμψης του απορροφόμενου νερού (Pappas *et al.*, 1998; Pappas, Tarantilis, Daliani, Mavromoustakos & Polissiou, 2002) και στην ύπαρξη του αμιδίου Ι, δεδομένου ότι η απορρόφηση είναι χαρακτηριστική των πρωτεϊνών (Pappas *et al.*, 1998; Schulz & Baranska, 2007; Bassbasi, De Luca, Ioele, Oussama & Ragno, 2014).

Ασύμμετρη τάση του $-COO^-$ παρατηρείται στη περιοχή των 1600 cm⁻¹, η οποία οφείλεται στις πηκτίνες (Chatjigakis *et al.*, 1998).

Η χαρακτηριστική κορυφή στην περιοχή των 1506 cm⁻¹ αποδίδεται στη λιγνίνη. Οφείλεται συγκεκριμένα στη παραμόρφωση του αρωματικού δακτυλίου της λιγνίνης (Pappas *et al.*, 1998, Vivekanand *et al.*, 2014).

Κάθε φάσμα παρουσιάζει μια κορυφή στην περιοχή 1434 - 1421 cm⁻¹, η οποία υποδηλώνει τη δόνηση κάμψης CH₂ (Pappas *et al.*, 2002; Schulz & Baranska, 2007),

το συνδυασμό της δόνησης παραμόρφωσης του –ΟΗ, τη δόνηση τάσης του C-O των φαινολών, τη δόνηση κάμψης COH των φαινολών και τη συμμετρική τάση δόνησης του –COO- που αποδίδεται στις πηκτίνες (Schulz & Baranska, 2007).

Στα 1374 cm⁻¹ περίπου εντοπίζονται απορροφήσεις που αποδίδονται στις δονήσεις κάμψης του CH₂ που χαρακτηρίζουν την κυτταρίνη (Alonso-Simón, Encina, García-Angulo, Álvarez & Acebes, 2004), δονήσεις κάμψης του –OH της κυτταρίνης (Pappas *et al.*, 2002) και δονήσεις τάσης του C-C (Socrates, 2001).

Η απορρόφηση στα 1335 - 1321 cm⁻¹ αντιπροσωπεύει τις σκελετικές δονήσεις του C-C και του C-O (Pappas *et al.*, 2002), τη δόνηση κάμψης C-H και τη δόνηση του δακτυλίου των πολυσακχαριτών (Schulz & Baranska, 2007).

Η κορυφή στη περιοχή 1249 - 1229 cm⁻¹ σχετίζεται με την εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -OH της κυτταρίνης (Pappas *et al.*, 2002), την ασύμμετρη τάση του PO_2^- των νουκλεϊκών οξέων και τη δόνηση τάσης του C-O-C των εστέρων. Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει τη λιγνίνη, σχετιζόμενη με τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O των φαινολικών δακτυλίων (Vivekanand *et al.*, 2014).

Η κορυφή στην περιοχή 1169-1162 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση τάσης C-O-C του γλυκοζιτικού δεσμού της κυτταρίνης (Alonso-Simón *et al.*, 2004), ενώ στην περιοχή ~1116 cm⁻¹ εντοπίζεται η αντισυμμετρική τάση του γλυκοζιτικού δεσμού.

Η κορυφή στα 897 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του β -γλυκοζιτικού δεσμού και η αυτή στα 870-830 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του α - γλυκοζιτικού δεσμού.

Στο σύνολο των φασμάτων, τόσο του αρχικού υλικού, όσο και αυτού μετά την υδροαπόσταξη, παρατηρείται κορυφή στην περιοχή των 1600 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στην ασύμμετρη τάση του –COO⁻ και οφείλεται στις πηκτίνες (Chatjigakis *et al.*, 1998). Ωστόσο, για το σύνολο των τεσσάρων πληθυσμών, η απορρόφηση είναι μικρότερη στο φυτικό υλικό μετά την υδροαπόσταξη, γεγονός που αναδεικνύει τη μερική εκχύλιση των πηκτινών κατά τη διαδικασία παραλαβής του αιθερίου ελαίου.

Παράλληλα, τόσο στα φάσματα του αρχικού φυτικού υλικού, όσο και σε αυτά του φυτικού υλικού μετά την υδροαπόσταξη, παρουσιάζεται η χαρακτηριστική κορυφή που αποδίδεται στη λιγνίνη (1506 cm⁻¹). Μεταξύ του κάθε ζεύγους φασμάτων για το σύνολο των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη, η κορυφή της λιγνίνης εμφανίζεται πιο έντονη στο φυτικό υλικό μετά την υδροαπόσταξη. Η λιγνίνη, ως βιοπολυμερές, είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, ενώ υπάρχουν άλλες υδατοδιαλυτές αρωματικές ενώσεις οι οποίες απορροφούν στην ίδια φασματική περιοχή. Συνεπώς, μετά τη διαδικασία της υδροαπόσταξης, η μείωση των υπολοίπων αρωματικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται περισσότερο ευδιάκριτη η κορυφή της λιγνίνης, η οποία εκχυλίζεται είτε λιγότερο είτε καθόλου.



Γράφημα 12 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του *Sideritis perfoliata* Α πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη.



Γράφημα 13 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του *Sideritis perfoliata* Β πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη.



Γράφημα 14 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του *Sideritis scardica* πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη.



Γράφημα 15 Τυπικά φάσματα FT-IR της δρόγης του Sideritis raeseri πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την υδροαπόσταξη.

Οι απορροφήσεις στην περιοχή των 1374 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις των δεσμών των μορίων της κυτταρίνης. Οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται στα *Sideritis raeseri* και *Sideritis scardica* μεταξύ του αρχικού φυτικού υλικού και του υλικού μετά την υδροαπόσταξη έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η κυτταρίνη εμφανίζει μικρή διαλυτότητα στο νερό. Αντίθετα, οι μεγαλύτερες διαφορές στις απορροφήσεις της κυτταρίνης στα *Sideritis perfoliata* A και *Sideritis perfoliata* B αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω. Η διαφοροποίηση αυτή ενδεχομένως σχετίζεται με την εντονότερη παρουσία τριχιδίων στα είδη αυτά, η απώλεια των οποίων κατά την διαδικασία της υδροαπόσταξης πιθανά οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση κυτταρίνης στο φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων.

Η απορρόφηση στα 1335 - 1321 cm⁻¹ αντιπροσωπεύει δονήσεις των μορίων των σακχάρων. Η μειωμένη απορρόφηση στα φάσματα του φυτικού υλικού μετά την υδροαπόσταξη μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία ορισμένων ευδιάλυτων στο νερό σακχάρων, τα οποία εκχυλίστηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του *Sideritis raeseri* εμφανίστηκε μικρή διαφοροποίηση στην περιοχή αυτή μεταξύ του αρχικού φυτικού υλικού και αυτού που προήλθε από την υδροαπόσταξη, γεγονός που πιθανά αποδίδεται στην ύπαρξη λιγότερων ευδιάλυτων στο νερό σακχάρων.

Η κορυφή στα 897 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του β-γλυκοζιτικού δεσμού και αυτή στην περιοχή 870 - 830 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του α-γλυκοζιτικού δεσμού. Παρατηρείται ότι στα Sideritis scardica και Sideritis perfoliata A η διαφοροποίηση μεταξύ του αρχικού υλικού και αυτού μετά την υδροαπόσταξη είναι εντονότερη, ενώ στα Sideritis raeseri και Sideritis perfoliata B εντοπίζονται λιγότερες εκχυλισμένες ουσίες. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να ερμηνεύεται από την ύπαρξη περισσότερων ευδιάλυτων στο νερό δισακχαριτών και ολιγοσακχαριτών στα πρώτα δύο είδη έναντι υψηλότερης συγκέντρωσης δυσδιάλυτων στο νερό πολυσακχαριτών στα δύο τελευταία.

Για την ακριβέστερη σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (correlation match value) για τα φάσματα FT-IR τόσο του αρχικού φυτικού υλικού, όσο και του υλικού που προέκυψε μετά την υδροαπόσταξη. Για τη σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή 1800-800 cm⁻¹, η οποία είναι τμήμα του δακτυλικού αποτυπώματος.

	Sideritis perfoliata A	Sideritis perfoliata B	Sideritis scardica	Sideritis raeseri
Sideritis perfoliata A	100,00			
Sideritis perfoliata B	95,78	100,00		
Sideritis scardica	98,23	96,19	100,00	
Sideritis raeseri	96,66	97,96	97,94	100,00

Πίνακας 9 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%) των φασμάτων FT-IR του αρχικού φυτικού υλικού των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη.

Σε ότι αφορά στο αρχικό φυτικό υλικό, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων DRIFTS των Sideritis perfoliata A και Sideritis scardica και ισούται με 98,23% (Πίνακας 9). Αντίθετα, τη χαμηλότερη μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζουν τα φάσματα των Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B (95,78%). Αν και η συγκριτικά χαμηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο πληθυσμών του Sideritis perfoliata αποτελεί επιπλέον ένδειξη για τη μικρή συγγένεια μεταξύ των δύο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, λόγω των υψηλών ποσοστών συσχέτισης μεταξύ του συνόλου των ειδών, η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική και στη συγκεκριμένη φάση ανάλυσης αδυνατεί να οδηγήσει σε ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Πίνακας 10 Τιμές του	συντελεστή συσχ	χέτισης (co	rrelation match	value) (%) two	v
φασμάτων FT-IR του	φυτικού υλικού	μετά την	υδροαπόσταξη	των τεσσάρω	v
πληθυσμών σιδερίτη.					

	Sideritis perfoliata A	Sideritis perfoliata B	Sideritis scardica	Sideritis raeseri
Sideritis perfoliata A	100,00			
Sideritis perfoliata B	99,14	100,00		
Sideritis scardica	96,96	96,71	100,00	
Sideritis raeseri	97,40	97,39	99,13	100,00

Σε ότι αφορά στο φυτικό υλικό μετά την υδροαπόσταξη, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων DRIFTS των Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B και ισούται με 99,14% (Πίνακας 10). Αντίθετα, τη χαμηλότερη μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζουν τα φάσματα των Sideritis perfoliata B και Sideritis scardica (96,71%). Η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική φαίνεται ότι και στην περίπτωση αυτή δεν ενδείκνυται για το διαχωρισμό μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι η διαφορά, ως προς τον συντελεστή συσχέτισης, μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων σιδερίτη καθιστά αναγκαία τη διεξοδικότερη διερεύνηση των φασματοσκοπικών προφίλ σε διαφορετικά στάδια της ανάλυσης και με περισσότερες τεχνικές.

3.3.2 Συγκριτική μελέτη φασματοσκοπικών προφίλ μέσω φασματοσκοπιών FT-IR – μέθοδος ATR

3.3.2.1 Υδατικά εκχυλίσματα μετά την υδροαπόσταζη

Τα φάσματα των υδατικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν μετά την υδροαπόσταξη των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη καταγράφηκαν, με χρήση της τεχνικής ATR. Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν τρία φάσματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη δημιουργία του μέσου φάσματος για κάθε πληθυσμό. Τα μέσα φάσματα FT-IR των τεσσάρων πληθυσμών παρουσιάζονται στη συνέχεια (Γράφημα 16 - Γράφημα 19).

Η πλατιά κορυφή στην περιοχή των 3300 cm⁻¹ οφείλεται στις υδροξυλικές ομάδες των σακχάρων των γλυκοζιτών που έχουν εκχυλιστεί, αλλά και σε μόρια διαλύτη που τυχόν δεν απομακρύνθηκαν κατά την ξήρανση (Socrates, 2001).

Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή 2940-2880 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H (v_{C-H}) (Socrates, 2001).

Οι απορροφήσεις στην περιοχή 1800 - 1500 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις τάσης του καρβονυλίου και των αρωματικών δακτυλίων. Στο σύνολο των φασμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων παρατηρείται μία κορυφή στα ~1730 cm⁻¹, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο καρβονύλιο των εστερικών ομάδων.

Η έντονη κορυφή στην περιοχή των 1600 cm⁻¹ οφείλεται στην αλληλεπικάλυψη της τάσης των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου, της απορρόφησης των καρβοξυλικών ανιόντων και στο δεσμευμένο νερό το οποίο δεν απομακρύνθηκε κατά



Γράφημα 16 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την υδροαπόσταξη του *Sideritis perfoliata* A.



Γράφημα 17 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την υδροαπόσταξη του *Sideritis perfoliata* B.



Γράφημα 18 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την υδροαπόσταξη του *Sideritis scardica*.



Γράφημα 19 Μέσο φάσμα FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε μετά την υδροαπόσταξη του *Sideritis raeseri*.

την ξήρανση των εκχυλισμάτων πριν τη λήψη του φάσματος.

Η κορυφή στα 1515 cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί στην τάση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου, ενώ και η απορρόφηση στην περιοχή των 1400 cm⁻¹ οφείλεται στον αρωματικό δακτύλιο, σε συνδυασμό με την εντός επιπέδου κάμψη του CH₂ και CH₃, καθώς και στη δόνηση τάσης του C-O και τη δόνηση παραμόρφωσης του –OH.

Στα 1280 cm⁻¹ παρατηρείται μία κορυφή που αποδίδεται στην εντός επιπέδου κάμψη του –ΟΗ καθώς και τη δόνηση τάσης C-O-C των εστέρων, ενώ η απορρόφηση στα 1068 cm⁻¹ αποδίδεται στις σκελετικές δονήσεις του δεσμού C-O των σακχάρων.

Για την ποσοτική σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη, τα τρία φάσματα που είχαν ληφθεί από τα υδατικά εκχυλίσματα μετά την υδροαπόσταξη του κάθε πληθυσμού σιδερίτη χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του μέσου φάσματος. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (correlation match value) των τριών αυτών φασμάτων με το μέσο φάσμα, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι το τελευταίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις συγκρίσεις μεταξύ των πληθυσμών. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης που προέκυψαν ήταν ικανοποιητικά υψηλές για το σύνολο των πληθυσμών (*Sideritis perfoliata* A: 97,8 - 99,6%; *Sideritis perfoliata* B: 93,8 - 97,9%; *Sideritis scardica*: 98,4 - 99,3%; *Sideritis raeseri*: 86,5 - 87,8%), επιτρέποντας τη χρήση των μέσω φασμάτων για τη σύγκριση μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων φασμάτων του υδατικού εκχυλίσματος μετά την υδροαπόσταξη των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή 1800-800 cm⁻¹.

Πίνακας 11 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%)των μέσων φασμάτων FT-IR του υδατικού εκχυλίσματος μετά την υδροαπόσταξη των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη.

	Sideritis perfoliata A	Sideritis perfoliata B	Sideritis scardica	Sideritis raeseri
Sideritis perfoliata A	100,00			
Sideritis perfoliata B	39,28	100,00		
Sideritis scardica	91,46	54,20	100,00	
Sideritis raeseri	66,53	45,76	70,78	100,00

Ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης παρατηρείται μεταξύ των μέσων φασμάτων ATR των υδατικών εκχυλισμάτων μετά την απόσταξη των Sideritis perfoliata A και Sideritis scardica και ισούται με 91,46% (Πίνακας 11), επαναλαμβάνοντας την εικόνα που παρουσιάστηκε για τα φάσματα του αρχικού φυτικού υλικού (Πίνακας 9). Αντίθετα, για τα υπόλοιπα ζεύγη πληθυσμών, οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης παρουσίασαν χαμηλές τιμές (39,28 - 70,78%), γεγονός που αναδεικνύει τη δυναμική της συγκεκριμένης τεχνικής στο διαχωρισμό μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών βάσει του φασματοσκοπικού προφίλ των υδατικών εκχυλισμάτων τους.

3.3.2.2 Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα

Τα φάσματα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη καταγράφηκαν με χρήση της τεχνικής ATR. Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα υδροαλκοολικά φάσματα ως είχαν, αλλά και μετά την όξινη υδρόλυσή τους. Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν τρία φάσματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη δημιουργία του μέσου φάσματος για κάθε πληθυσμό. Τα μέσα φάσματα FT-IR των τεσσάρων πληθυσμών παρουσιάζονται στη συνέχεια (Γράφημα 20 - Γράφημα 23).

Οι αποδόσεις των κορυφών που παρατηρούνται είναι κοινές με αυτές που αναφέρθηκαν στην περίπτωση των φασμάτων του υδατικού εκχυλίσματος μετά την υδροαπόσταξη (Κεφάλαιο 3.4.2.1).

Για την ακριβέστερη σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (correlation match value) για τα φάσματα FT-IR των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τόσο πριν όσο και μετά την όξινη υδρόλυσή τους. Για τη σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή 1800-800 cm⁻¹.

Αρχικά υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (correlation match value) μεταξύ του φάσματος του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος πριν και μετά την όξινη υδρόλυση για κάθε πληθυσμό. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης που προέκυψαν ήταν 58,31% για το Sideritis perfoliata A; 57,83% για το Sideritis perfoliata B, 49,01 %



Γράφημα 20 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis perfoliata Α πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση.



Γράφημα 21 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Sideritis perfoliata* B πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση.



Γράφημα 22 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis scardica πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση.



Γράφημα 23 Τυπικά φάσματα FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του Sideritis raeseri πριν (μπλε φάσμα) και μετά (κόκκινο φάσμα) την όξινη υδρόλυση.

για το Sideritis scardica και 58,58% για το ; Sideritis raeseri. Οι χαμηλές τιμές του συντελεστή συσχέτισης σε κάθε περίπτωση πιστοποιούν την επιτυχία της διαδικασίας της όξινης υδρόλυσης στην απομάκρυνση των σακχάρων από το συνολικό αρχικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα που βρίσκονταν με τη μορφή γλυκοζιτών.

Πίνακας 12 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%)των φασμάτων FT-IR του αρχικού υδρομεθανολικού εκχυλίσματος των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη.

	Sideritis perfoliata A	Sideritis perfoliata B	Sideritis scardica	Sideritis raeseri
Sideritis perfoliata A	100,00			
Sideritis perfoliata B	96,96	100,00		
Sideritis scardica	94,97	97,95	100,00	
Sideritis raeseri	94,31	97,87	97,63	100,00

Πίνακας 13 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) (%) των φασμάτων FT-IR του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος μετά από όξινη υδρόλυση των τεσσάρων πληθυσμών σιδερίτη.

	Sideritis perfoliata A	Sideritis perfoliata B	Sideritis scardica	Sideritis raeseri
Sideritis perfoliata A	100,00			
Sideritis perfoliata B	95,72	100,00		
Sideritis scardica	96,36	96,29	100,00	
Sideritis raeseri	96,32	96,33	98,61	100,00

Σε ότι αφορά στις συγκρίσεις μεταξύ των αρχικών υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων ATR των Sideritis perfoliata B και Sideritis scardica και ισούται με 97,95% (Πίνακας 12). Αντίθετα, τη χαμηλότερη μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζουν τα φάσματα των Sideritis perfoliata A και Sideritis raeseri (94,31%). Λόγω των υψηλών ποσοστών συσχέτισης μεταξύ του συνόλου των ειδών, η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική και στη συγκεκριμένη φάση ανάλυσης αδυνατεί να οδηγήσει σε ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Σε ότι αφορά στις συγκρίσεις μεταξύ των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων μετά την όξινη υδρόλυσή τους, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων ATR των Sideritis raeseri και Sideritis scardica και ισούται με 98,61% (Πίνακας 13). Αντίθετα, τη χαμηλότερη μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζουν τα φάσματα των Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B (95,72%). Η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική φαίνεται ότι και στην περίπτωση αυτή δεν επιτυγχάνει το διαχωρισμό μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών.

3.4 Πολυμεταβλητή χημειομετρική ανάλυση

Στο πλαίσιο της πολυμεταβλητής χημειομετρικής ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων της παρούσας εργασίας, κρίθηκε σκόπιμη η διακριτή στατιστική μελέτη των συστατικών του αιθερίου ελαίου και των συστατικών των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων, αλλά και η ανάλυση των δεδομένων αυτών ως σύνολο, προκειμένου η μελέτη του χημικού προφίλ των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών να είναι κατά το δυνατό περισσότερο εύρωστη.

3.4.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis)

Ο καθορισμός του αριθμού των κύριων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε και με τις τρεις μεθόδους που προτείνονται από τους Lehman, O'Rourke, Hatcher & Stepanski, (2005), δηλαδή με χρήση του κριτηρίου των Kaiser-Guttman, μέσω scree test και βάσει του αθροιστικού ποσοστού της παραλλακτικότητας το οποίο ερμηνεύουν. Το κριτήριο των Kaiser-Guttman προβλέπει τη χρήση ως κύριων συνιστωσών των παραγόντων των οποίων η ιδιοτιμή είναι μεγαλύτερη από 1,00. Σύμφωνα με το scree test, από τη διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των συνιστωσών προς την ιδιοτιμή τους, μπορεί να καθοριστεί ο αριθμός των κύριων συνιστωσών ως ο αριθμός που προηγείται του σημείου στο οποίο η καμπύλη αρχίζει να κινείται ασυμπτωτικά προς τον οριζόντιο άξονα. Τέλος, η εφαρμογή του τελευταίου κριτηρίου βασίζεται στην επιλογή των συνιστωσών που ερμηνεύουν το 70-80% της αθροιστικής παραλλακτικότητας που ερμηνεύεται.

3.4.1.1 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου

Στο πλαίσιο της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου, οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ποσοστά των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα αιθέρια έλαια των τεσσάρων πληθυσμών, όπως αυτά προέκυψαν μετά την ανάλυση βάσει GC-MS (Πίνακας 7). Ο Πίνακας 14 παρουσιάζει των αριθμό των κύριων συνιστωσών κατά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου, την ιδιοτιμή τους και το ποσοστό της

παραλλακτικότητας που ερμηνεύεται σε κάθε περίπτωση. Η εφαρμογή του κριτηρίου των Kaiser-Guttman οδήγησε στην επιλογή τριών κύριων συνιστωσών.

Πίνακας 14 Αριθμός κύριων συνιστωσών για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου ακολουθούμενος από την αντίστοιχη ιδιοτιμή, το ποσοστό παραλλακτικότητας που αποδίδεται σε κάθε παράγοντα και την αθροιστική παραλλακτικότητα που ερμηνεύει κάθε σύνολο παραγόντων.

Αριθμός	Ιδιοτιμή	Ποσοστό Παραλλακτικότητας	Αθροιστική Παραλλακτικότητα
1	22,33	53,18	53,18
2	12,19	29,02	82,20
3	7,48	17,80	100,00

Στο **Γράφημα 24** απεικονίζονται οι ιδιοτιμές που αντιστοιχούν στους διάφορους αριθμούς κυρίων συνιστωσών. Σύμφωνα με το scree test, από μια τέτοια διαγραμματική απεικόνιση μπορεί να καθοριστεί ο αριθμός των κύριων συνιστωσών ως ο αριθμός που προηγείται του σημείου στο οποίο η καμπύλη αρχίζει να κινείται ασυμπτωτικά προς τον οριζόντιο άξονα. Λόγω του μικρού αριθμού των συνιστωσών, ο βέλτιστος αριθμός κυρίων συνιστωσών με χρήση του κριτηρίου αυτού καθορίζεται στις τρεις.



Γράφημα 24 Απεικόνιση του αριθμού κυρίων συνιστωσών και της αντίστοιχης ιδιοτιμής για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου.

Τέλος, η εφαρμογή του τελευταίου κριτηρίου βασίζεται στην επιλογή των συνιστωσών που ερμηνεύουν το 70-80% της αθροιστικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται (Lehman *et al.*, 2005). Επομένως, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακας 14, η εφαρμογή του κριτηρίου αυτού συστήνει την επιλογή δύο κύριων συνιστωσών.

Δεδομένου ότι πρόκειται για πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, κρίνεται ότι το σύνολο της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας μπορεί να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης μεταξύ των εξεταζόμενων ειδών. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν τρεις κύριες συνιστώσες, οι οποίες αντιστοιχούν σε ερμηνεία του 100% της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας.

Για τη διευκόλυνση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, εφαρμόστηκε περιστροφή (rotation) των κύριων συνιστωσών με τη μέθοδο *varimax*.

Σύμφωνα με τους Lehman et al. (2005), μία μεταβλητή μπορεί να περιληφθεί σε μία κύρια συνιστώσα, όταν παρουσιάζει απόλυτη τιμή μεγαλύτερη από 0,40 για τη συνιστώσα αυτή. Μεταβλητές που παρουσιάζουν απόλυτες τιμές μεγαλύτερες από 0,40 για περισσότερες από μία κύριες συνιστώσες θα πρέπει να εξαιρεθούν από την ερμηνεία της ανάλυσης. Έτσι, τα αποτελέσματα της περιστροφής για κάθε κύρια συνιστώσα και για τα χαρακτηριστικά που κατανεμήθηκαν σε κάποια από αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακας 15.

Τα χαρακτηριστικά που κατανέμονται στην πρώτη κύρια συνιστώσα ερμηνεύουν το 53,2% της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας και είναι τα ποσοστά στο αιθέριο έλαιο των εξής ουσιών: Ζ-καρυοφυλλένιο, δεκατετρανάλη, *n*-δεκαπεντανόλη, *E*,*E*-λιναλοολικό γερανύλιο, 2-δεκαπεντανόνη, δεκανοϊκό οξύ, καουρ-15-ένιο, μανοολοξείδιο, 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο, *n*-δεκαεξανόλη, *E*,*Z*-λιναλοολικό γερανύλιο, λινελαϊκός μεθυλεστέρας, νεο-αμπιετόλη.

Στη δεύτερη κύρια συνιστώσα κατανέμονται τα ποσοστά στο αιθέριο έλαιο των: μυρκενίου, φελλανδρένιου (Α), α-κουμπεμπένιου, β-ελεμένιου, α-γουργουνένιου, *trans*-καδινα-1 (6),4-διένιου, εδικαρυόλης και γ-μουουρολένιου. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το 29% της συνολικής παραλλακτικότητας.

Η τρίτη κύρια συνιστώσα περιλαμβάνει τα ποσοστά στο αιθέριο έλαιο του λιμονένιου και του πρεμνασπειροδιένιου και ερμηνεύει το 17,8% της παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ουσίες που βρέθηκε να κατανέμονται σε κάποια από τις κύριες συνιστώσες ανήκουν στο σύνολό τους στις ουσίες αυτές που είχε προταθεί να μελετηθούν περαιτέρω ως προς τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως

χημειοταξινομικών δεικτών (Κεφάλαιο 3.1.2), γεγονός που υποστηρίζει την πρόταση αυτή.

Πίνακας 15 Αποτελέσματα της περιστροφής varimax για κάθε συστατικό του αιθερίου ελαίου και κάθε μία από τις 3 κύριες συνιστώσες που καθορίστηκαν. Παρουσιάζονται μόνο τα δεδομένα για τις μεταβλητές που κατανεμήθηκαν σε κάποια κύρια συνιστώσα.

Μεταβλητές	1 ^η Κ.Σ.	2 ^η Κ.Σ.	3 ^η Κ.Σ.
μυρκένιο	-0,11	0,99	0,12
φελλανδρένιο (Α)	-0,11	0,99	0,12
λιμονένιο	-0,35	0,31	0,88
α-κουμπεμπένιο	-0,11	0,99	0,12
β-ελεμένιο	-0,11	0,99	0,12
α-γουργουνένιο	-0,11	0,99	0,12
Ζ-καρυοφυλλένιο	-0,88	-0,28	-0,39
πρεμνασπειροδιένιο	-0,39	-0,24	0,88
<i>trans</i> -καδινα-1 (6),4-διένιο	-0,11	0,99	0,12
εδικαρυόλη	-0,11	0,99	0,12
γ-μουουρολένιο	-0,11	0,99	0,12
δεκατετρανάλη	0,97	-0,21	-0,13
<i>n</i> -δεκαπεντανόλη	0,97	-0,21	-0,13
Ε,Ε-λιναλοολικό γερανύλιο	0,97	-0,21	-0,13
2-δεκαπεντανόνη	0,97	-0,21	-0,13
δεκανοϊκό οξύ	0,97	-0,21	-0,13
καουρ-15-ένιο	0,97	-0,21	-0,13
μανοολοξείδιο	0,97	-0,21	-0,13
2Ε-οξικό δωδεκακενύλιο	0,97	-0,21	-0,13
<i>n</i> -δεκαεξανόλη	0,97	-0,21	-0,13
Ε,Ζ-λιναλοολικό γερανύλιο	0,97	-0,21	-0,13
λινελαϊκός μεθυλεστέρας	0,97	-0,21	-0,13
νεο-αμπιετόλη	0,97	-0,21	-0,13

3.4.1.2 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα

Στο πλαίσιο της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ποσοστά των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα (Πίνακας 8) των τεσσάρων πληθυσμών, όπως αυτά προέκυψαν μετά την ανάλυση βάσει LC-MS, καθώς επίσης και τα ποσοστά συσχέτισης (correlation match value) μεταξύ των φασμάτων των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων πριν και μετά την όξινη υδρόλυση (Πίνακες 12 και 13). Ο Πίνακας 16 παρουσιάζει των αριθμό των κύριων συνιστωσών κατά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, την ιδιοτιμή τους και το ποσοστό της παραλλακτικότητας που ερμηνεύεται σε κάθε περίπτωση. Η εφαρμογή του κριτηρίου των Kaiser-Guttman οδήγησε στην επιλογή τριών κύριων συνιστωσών.

Πίνακας 16 Αριθμός κύριων συνιστωσών για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα ακολουθούμενος από την αντίστοιχη ιδιοτιμή, το ποσοστό παραλλακτικότητας που αποδίδεται σε κάθε παράγοντα και την αθροιστική παραλλακτικότητα που ερμηνεύει κάθε σύνολο παραγόντων.

 Αριθμός	Ιδιοτιμή Ποσοστό Αθρο Παραλλακτικότητας Παραλλ		Αθροιστική Παραλλακτικότητα
 1	10,54	58,57	58,57
2	5,62	31,25	89,82
3	1,83	10,18	100,00

Στο **Γράφημα 25** απεικονίζονται οι ιδιοτιμές που αντιστοιχούν στους διάφορους αριθμούς κυρίων συνιστωσών. Σύμφωνα με το scree test, από μια τέτοια διαγραμματική απεικόνιση μπορεί να καθοριστεί ο αριθμός των κύριων συνιστωσών ως ο αριθμός που προηγείται του σημείου στο οποίο η καμπύλη αρχίζει να κινείται ασυμπτωτικά προς τον οριζόντιο άξονα. Λόγω του μικρού αριθμού των συνιστωσών, ο βέλτιστος αριθμός κυρίων συνιστωσών με χρήση του κριτηρίου αυτού καθορίζεται στις τρεις.



Γράφημα 25 Απεικόνιση του αριθμού κυρίων συνιστωσών και της αντίστοιχης ιδιοτιμής για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

Τέλος, η εφαρμογή του τελευταίου κριτηρίου βασίζεται στην επιλογή των συνιστωσών που ερμηνεύουν το 70-80% της αθροιστικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται (Lehman *et al.*, 2005). Επομένως, όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακας 16**, η εφαρμογή του κριτηρίου αυτού συστήνει την επιλογή δύο κύριων συνιστωσών.

Δεδομένου ότι, και στην περίπτωση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, πρόκειται για πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, κρίνεται ότι το σύνολο της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας μπορεί να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης μεταξύ των εξεταζόμενων ειδών. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν τρεις κύριες συνιστώσες, οι οποίες αντιστοιχούν σε ερμηνεία του 100% της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας.

Για τη διευκόλυνση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, εφαρμόστηκε περιστροφή (rotation) των κύριων συνιστωσών με τη μέθοδο *varimax*.

Η κατανομή των μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες έγινε βάσει των κριτηρίων των Lehman *et al.* (2005), όπως αυτά περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 3.4.1.1. Τα αποτελέσματα της περιστροφής για κάθε κύρια συνιστώσα και για τα χαρακτηριστικά που κατανεμήθηκαν σε κάποια από αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακας 17.

Τα χαρακτηριστικά που κατανέμονται στην πρώτη κύρια συνιστώσα ερμηνεύουν το 58,6% της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας και είναι ο συντελεστής συσχέτισης με το FT-IR φάσμα του μη υδρολυμένου εκχυλίσματος του Sideritis perfoliata A και ο αντίστοιχος για το FT-IR φάσμα του μη υδρολυμένου εκχυλίσματος του Sideritis raeseri.

Στη δεύτερη κύρια συνιστώσα καταν
έμονται το ποσοστό του 7-Ο-[6΄΄΄-Ο- ακετυλο]-αλλοσυλο
(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης στα αρχικά

υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, καθώς και οι συντελεστές συσχέτισης με τα FT-IR φάσματα του μη υδρολυμένου και του υδρολυμένου εκχυλίσματος του *Sideritis perfoliata* B. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το 31,2% της συνολικής παραλλακτικότητας.

Η τρίτη κύρια συνιστώσα περιλαμβάνει τα ποσοστά του 7-Ο-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτη της λουτεολίνης και 7-Ο-[6^{···}-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο(1 \rightarrow 2) γλυκοζίτη της υπολαετίνης στα μη υδρολυμένα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών. Ερμηνεύει το 10,2% της παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε.

Πίνακας 17 Αποτελέσματα της περιστροφής varimax για κάθε μεταβλητή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων και κάθε μία από τις 3 κύριες συνιστώσες που καθορίστηκαν. Παρουσιάζονται μόνο τα δεδομένα για τις μεταβλητές που κατανεμήθηκαν σε κάποια κύρια συνιστώσα.

Μεταβλητές	1 ^η Κ.Σ.	2 ^η Κ.Σ.	3 ^η Κ.Σ.
7-Ο-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,28	0,09	0,95
7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της υπολαετίνης	0,03	-0,03	0,99
7-Ο-[6΄΄΄-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο (1→2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης	-0,37	-0,93	-0,05
συντελεστής συσχέτισης με το FT-IR φάσμα του μη υδρολυμένου εκχυλίσματος του <i>Sideritis perfoliata</i> A	-0,90	-0,29	-0,32
συντελεστής συσχέτισης με το FT-IR φάσμα του μη υδρολυμένου εκχυλίσματος του <i>Sideritis perfoliata</i> B	-0,05	0,99	-0,02
συντελεστής συσχέτισης με το FT-IR φάσμα του υδρολυμένου εκχυλίσματος του <i>Sideritis perfoliata</i> B	-0,22	0,97	-0,14
συντελεστής συσχέτισης με το FT-IR φάσμα του μη υδρολυμένου εκχυλίσματος του Sideritis raeseri	0,97	-0,20	0,14

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γεγονός πως κατανεμήθηκαν σε κάποια από τις κύριες συνιστώσες τέσσερις συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των φασμάτων FT-IR αναδεικνύει τη δυναμική της υπέρυθρης φασματοσκοπίας ως χημειοταξινομικού

εργαλείου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι συντελεστές αυτοί βρέθηκαν να ερμηνεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας, προτείνεται η περαιτέρω μελέτη και αξιοποίηση μεθόδων και τεχνικών της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με σκοπό την ανάπτυξη εύρωστων μοντέλων διάκρισης σε συνδυασμό με κατάλληλες χημειομετρικές μεθόδους.

3.4.2. Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis)

Η ιεραρχική ανάλυση συστάδων πραγματοποιήθηκε αρχικά με τη μέθοδο Ward. Ωστόσο, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου αυτής στην ύπαρξη ακραίων τιμών (SAS Institute Inc., 2010.), η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και με τη μέθοδο Centroid.

3.4.2.1 Ανάλυση Συστάδων για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου

Από την ιεραρχική ανάλυση με τη μέθοδο Ward και την ομαδοποίηση σε συστάδες, προέκυψε ότι τα Sideritis perfoliata B και Sideritis raeseri εμφανίζουν τη μικρότερη απόσταση σύνδεσης. Στη συστάδα που σχηματίζουν οι δύο αυτοί πληθυσμοί συνδέεται, στη συνέχεια, το Sideritis perfoliata A, ενώ πιο απομακρυσμένο από τα τρία αυτά είδη εμφανίζεται το Sideritis scardica (Γράφημα 26). Η ανάλυση με τη μέθοδο Centroid (Γράφημα 27) ανέδειξε διαφορές στις αποστάσεις σύνδεσης μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών, χωρίς ωστόσο να διαφοροποιείται η ομαδοποίηση σε συστάδες από αυτή που προέκυψε με χρήση της μεθόδου Ward.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συστάδων αναδεικνύουν την απόκλιση των δύο πληθυσμών Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B σε ότι αφορά στη σύσταση του αιθερίου ελαίου. Η διαφοροποίηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση για τις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών πληθυσμών και ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για διαφορετικά υποείδη.

s, perfoliata A	6 27
s, perfoliata B	5,23
s, raeseri	
s, scardica	I

Γράφημα 26 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Ward βάσει των συστατικών του αιθερίου ελαίου. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης.



Γράφημα 27 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Centroid βάσει των συστατικών του αιθερίου ελαίου. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης.

3.4.2.2 Ανάλυση Συστάδων για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα

Για την Ανάλυση Συστάδων για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές που περιλήφθηκαν στην Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Κεφάλαιο 3.4.1.2).

Από την ιεραρχική ανάλυση με τη μέθοδο Ward και την ομαδοποίηση σε συστάδες, προέκυψε ότι τα Sideritis raeseri και Sideritis scardica εμφανίζουν τη μικρότερη απόσταση σύνδεσης. Σε διακριτή συστάδα ομαδοποιούνται ακολούθως και με μεγαλύτερη απόσταση σύνδεσης τα Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata

Β (Γράφημα 28). Η ανάλυση με τη μέθοδο Centroid (Γράφημα 29) ανέδειξε διαφορές στις αποστάσεις σύνδεσης, αλλά και στον τρόπο ομαδοποίησης σε συστάδες. Συγκεκριμένα, τα Sideritis scardica και Sideritis raeseri εμφανίζουν τη μικρότερη απόσταση σύνδεσης. Στη συστάδα που σχηματίζουν οι δύο αυτοί πληθυσμοί συνδέεται, στη συνέχεια, το Sideritis perfoliata B, ενώ πιο απομακρυσμένο από τα τρία αυτά είδη εμφανίζεται το Sideritis perfoliata A.



Γράφημα 28 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Ward βάσει των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης.



Γράφημα 29 Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων πληθυσμών με χρήση της μεθόδου Centroid βάσει των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων. Αναγράφονται οι αποστάσεις σύνδεσης. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των αποτελεσμάτων της ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μέθοδο Ward και τη μέθοδο Centroid μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή ευαισθησία της πρώτης στην ύπαρξη ακραίων τιμών (SAS Institute Inc., 2010.). Για το λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη των χημικών προφίλ των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων σιδερίτη με την προσθήκη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων των ίδιων, αλλά και επιπλέον ειδών και πληθυσμών, προκειμένου να αυξηθεί η ευρωστία του χημειομετρικού μοντέλου.

4. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την ανάλυση και τη συγκριτική μελέτη του χημικού προφίλ (αιθέριο έλαιο, υδρομεθανολικά εκχυλίσματα) των Sideritis scardica, Sideritis perfoliata και Sideritis raeseri. Παράλληλα, επιχειρήθηκε να διαπιστωθεί εάν η φαινοτυπική παραλλακτικότητα μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων Sideritis perfoliata (A και B) συνδυάζεται με διακριτό χημικό προφίλ.

Σε ότι αφορά στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο, το σύνολο των πληθυσμών παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλές τιμές, με τα Sideritis perfoliata A και Sideritis perfoliata B, ωστόσο, να εμφανίζουν σχεδόν διπλάσιες αποδόσεις από τα Sideritis scardica και Sideritis raeseri.

Σχετικά με τη σύσταση του αιθερίου ελαίου, στο Sideritis perfoliata Α κυριαρχούν οι μονοτερπενικοί και σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες, με κυρίαρχα συστατικά το *a*-πινένιο, το *cis*-καλαμενένιο και το *γ*-γουργουνένιο. Αντίθετα, στον πληθυσμό Sideritis perfoliata Β κυριαρχούν τα μη οξυγονούχα σεσκιτερπένια (*Z*καρυοφυλλένιο, *cis*-καλαμενένιο, δικυκλογερμακρένιο). Τα μη οξυγονούχα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια παρουσιάστηκαν ως κυρίαρχα συστατικά στο αιθέριο έλαιο του Sideritis raeseri (*Z*-καρυοφυλλένιο, δικυκλογερμακρένιο, *α*- και *β*πινένιο). Το αιθέριο έλαιο του Sideritis scardica παρουσίασε διακριτή εικόνα από τους υπόλοιπους τρεις πληθυσμούς, με κυρίαρχα συστατικά το 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο και το δεκανοϊκό οξύ και χαμηλά ποσοστά μονο- και σεσκιτερπένιων.

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των τεσσάρων εξεταζόμενων πληθυσμών βρέθηκαν να περιέχουν, μεταξύ άλλων, παράγωγα υδροκιναμικού οξέος, γλυκοζίτες φαινυλαιθανοειδών, καθώς και γλυκοζίτες και ακετυλογλυκοζίτες φλαβονοειδών. Στο *Sideritis perfoliata* A, όπως και στο *Sideritis raeseri*, κύριο συστατικό ήταν ο 7-O-[6^{'''}-O-ακετυλο]-αλλοσυλο(1→2) γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης, ακολουθούμενος από το βερμπασκοζίτη. Στο *Sideritis perfoliata* B κυριαρχούν ο 7-O-[6^{'''}-O-ακετυλο]-αλλοσυλο(1→2) γλυκοζίτης της 4[']-O-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης, ακολουθούμενος από τις δύο ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο *Sideritis perfoliata* A. Οι δύο αυτές ενώσεις είναι κυρίαρχες και στο εκχύλισμα του *Sideritis scardica*, από κοινού με τον 7-O-[6^{'''}-O-ακετυλο]-αλλοσυλο(1→2)-[6["]-O-ακετυλο]-γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης.

Σε ότι αφορά τη συγκριτική φασματοσκοπική μελέτη των πληθυσμών βάσει της υπέρυθρης φασματοσκοπίας, δεν ήταν επιτυχής η διάκριση μεταξύ τους βάσει των φασμάτων DRIFTS τόσο του αρχικού φυτικού υλικού, όσο και αυτού μετά την υδροαπόσταξη. Ομοίως, μη ικανοποιητικός κρίνεται ο διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών βάσει των φασμάτων ATR των μη υδρολυμένων και υδρολυμένων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τους. Αντίθετα, αναδεικνύεται ότι η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων ATR των υδατικών εκχυλισμάτων μετά την

υδροαπόσταξη του φυτικού υλικού μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διάκριση των εξεταζόμενων πληθυσμών.

Από τη χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν στα συστατικά του αιθερίου ελαίου, αναδεικνύεται ότι ορισμένα από τα συστατικά ενδέχεται να μπορούν να αξιοποιηθούν ως χημειοταξινομικοί δείκτες (π.χ. Ζ-καρυοφυλλένιο, δεκατετρανάλη, *n*-δεκαπεντανόλη, *E*,*E*-λιναλοολικό γερανύλιο, 2-δεκαπεντανόνη, δεκανοϊκό οξύ, καουρ-15-ένιο, μανοολοξείδιο, 2*E*-οξικό δωδεκακενύλιο, *n*-δεκαεξανόλη, *E*,*Z*-λιναλοολικό γερανύλιο, λινελαϊκός μεθυλεστέρας, νεο-αμπιετόλη, κ.ά.).

Σε ότι αφορά στη χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, αναδεικνύεται ότι οι συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των φασμάτων ATR ερμηνεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας, υπογραμμίζοντας τη δυναμική της υπέρυθρης φασματοσκοπίας ως χημειοταξινομικού εργαλείου.

Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης συστάδων τόσο βάσει του προφίλ του αιθερίου ελαίου, όσο και αυτού των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων αναδεικνύουν την απόκλιση των δύο πληθυσμών *Sideritis perfoliata* A και *Sideritis perfoliata* B, διαφοροποίηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση για τις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών πληθυσμών και ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για διαφορετικά υποείδη.

Βιβλιογραφία

Γαβριέλη, Χ. (1991). Απομόνωση και ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών του φυτού Sideritis raeseri. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

<http://phdtheses.ekt.gr/eadd/handle/10442/1912>

- Γκόλιαρης, Α. (1995). Γενετική μελέτη στο ελληνικό τσάι του βουνού (Sideritis L.). Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. < http://phdtheses.ekt.gr/eadd/handle/10442/8991>
- Κουτσός, Θ.Β. (2006). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ. 301-308.
- Παληογιάννη, Α.Π. (2007). Μελέτη Πτητικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων-Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. http://www.keosoe.gr/pdf/erefna_pened/didaktoriko_palaiogianni.pdf
- Ταραντίλης, Π.Α., Πολυσίου, Μ.Γ. & Παππάς, Χ.Σ. (2013). Ενόργανη Ανάλυση Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Αθήνα, σελ. 6-22.
- Aboutabl, E.A., Nassar, M.I., Elsakhawy, F.M., Maklad, Y.A., Osman, A.F., El-Khrisy, E.A.M. (2002). Phytochemical and pharmacological studies on *Sideritis taurica* Stephan ex Wild. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 177 – 184.
- Akços, Y., Ezer, N., Çalis, I., Demirdamar, R., Tel, BC. (1999). Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their antiinflammatory activity. *Pharmaceutical Biology*, 37, 118 - 122.
- Alcaraz, M.J. & Tordera, M. (1988). Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside. *Phytotherapy Research*, 2(2), 85-88.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I.B., Mitakou, S., Gikas, E. & Tsarbopoulos, A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 811-815.
- Alonso-Simón, A., Encina, A.E., García-Angulo, P., Álvarez, J.M., & Acebes, J.L. (2004). FTIR spectroscopy monitoring of cell wall modifications during the habituation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures to dichlobenil. *Plant Science*, 167(6), 1273-1281.

- Aslan, I., Kiliç, T., Gören, A., Topçu, G. (2006). Toxicity of acetone extract of Sideritis trojana and 7-epicandicandiol, 7-epicandicandiol diacetate and 18acetylsideroxol against stored pests Acanthoscelides obtectus (Say), Sitophilus granarius (L.) and Ephestia kuehniella (Zell). Industrial Crops and Products, 23, 171 - 176.
- Bas, E., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Cerda-Nicolás, M., Ríos, J.L. (2006). Anti-inflammatory activity of 5-O-Demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Medica*, 72, 136 - 142.
- Baser, K.H.C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*, 74(4), 527-545.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D. & Vuotto, M.L. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 240–248.
- Bassbasi, M., De Luca, M., Ioele, G., Oussama, A., & Ragno, G. (2014). Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), 210-215.
- Bojović, D., Janković, S., Potpara, Z., & Tadić, V. (2011). Summary of the phytochemical research performed to date on *Sideritis* species. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, *12*(3), 109-122.
- Bondi, M., Bruno, M., Piozzi, F., Baser, K.H.C., Simmonds, M. (2000). Diversity and antifeedant activity of diterpenes from Turkish species of *Sideritis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 299 – 303.
- Charami, M.T., Lazari, D., Karioti, A., Skaltsa, H., Hadjipavlou-Litina, D., Souleles, C. (2008). Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 22, 450 – 454.
- Chatjigakis, A. K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., & Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37(4), 395-408.
- de las Heras, B., Hoult, J.R.S. (1994). Non-cytotoxic inhibition of macrophage eicosanoid biosynthesis and effects on leukocyte functions and reactive oxygen species of two novel anti-inflammatory plant diterpenoids. *Planta Medica*, 60, 501 506.
- de las Heras, B., Vivas, J.M., Villar, A. (1994). Anti-inflammatory activity of *Sideritis javalambrensis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *41*, 15 17.
- de las Heras, B., Navarro, A., Diaz-Guerra, M.J., Bermejo, P., Castrillo, A., Bosca, L., Villar, A. (1999). Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-κB by andalusol. *British Journal of Pharmacology, 128*, 605 – 612.
- de las Heras, B., Abad, M.J., Silvan, A.M., Pascual, R., Bermejo, P., Rodriguez, B., Villar, A.M. (2001). Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sciences*, *70*, 269 278.
- Dulger, B., Gonuz, A. & Bican, T. (2005α). Antimicrobial studies on three endemic species of Sideritis from Turkey. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2), 153-156.
- Demirtas, I., Sahin, A., Ayhan, B., Tekin, S., Telci, I. (2009). Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Records of Natural Products*, *3*, 104 109.
- Díaz, R.M., García-Granados, A., Moreno, E., Parra, A., Quevedo-Sarmiento, J., Sáenz de Buruaga, A., Sáenz de Buruaga, J.M. (1988). Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of diterpenoid compounds from *Sideritis*. *Planta Medica*, 54, 301 – 304.
- Dulger, B., Ugurlu, E., Aki, C., Suerdem, T.B., Camdeviren, A., Tazeler, G. (2005β). Evaluation of antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Sideritis*, and *Stachys* species from Turkey. *Pharmaceutical Biology*, *43*, 270 – 274.
- Dulger, B., Gonuz, A., Aysel, V. (2006). Inhibition of clotrimazole-resistant Candida albicans by some endemic Sideritis species from Turkey. Fitoterapia, 77, 404 - 405.
- Ertas, A., Öztürk, M., Boğa, M., Topçu, G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of ent-kaurane diterpenoids from *Sideritis arguta*. *Journal of Natural Products*, 72, 500 502.
- Ferrándiz, L., Ramachandran Nair, A.G., Alcaraz, M.J. (1990). Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie*, 45, 206 - 208.
- Fraga, B.M. (2012). Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. *Phytochemistry*, *76*, 7-24.

- Fraga, B.M., Hernández, M.G. & Diaz, C.E. (2003). On the *ent*-kaurene diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Research*, *17*(2), 141-144.
- Fraga, B.M., Hernández, M.G., Fernández, C. & Santana, J.M.H. (2009). A chemotaxonomic study of nine Canarian Sideritis species. Phytochemistry, 70(8), 1038-1048.
- Gabrieli, C.N., Kefalas, P.G., & Kokkalou, E.L. (2005). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 423-428.
- García-Granados, A., Martínez, A., Molina, A. & Onorato, M.E. (1986). Terpenoids from *Sideritis varoi* subsp. *oriensis*. *Phytochemistry*, 25(9), 2171-2173.
- Godoy, A., de las Heras, B., Vivas, J.M., Villar, A. (2000). Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 1193 1197.
- Gonzáles-Burgos, E., Carretero, M.E. & Gómez-Serranillos, M.P. (2011). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities A review. *Journal of Ethnopharmacology*, *135*, 209–225.
- Gürbüz, I., Özkan, A.M., Yesilada, E., Kutsal, O. (2005). Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, *101*(*1*), 313-318.
- Güvenç, A., Houghton, P.J., Duman, H., Coşkun, M., Şahin, P. (2005). Antioxidant activity studies on selected *Sideritis* species native to Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 43, 173 177.
- Halfon, B., Gören, A.C., Ertaş, A. & Topçu, G. (2011). Complete ¹³C NMR assignments for *ent*-kaurane diterpenoids from *Sideritis* species. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(5), 291-294.
- Hernandez-Perez, M., Rabanal, R.M. (2002). Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. *pannosa* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 43 47.
- Hernandez-Perez, M., Rabanal Gallego, M. (2002). Analgesic and anti-inflammatory properties of *Sideritis lotsyi* var. *mascaensis*. *Phytotherapy Research*, *16*, 264 266.
- Hernandez-Perez, M., Sanchez-Mateo, C.C., Montalbetti-Moreno, Y., Rabanal, R.M. (2004). Studies on the analgesic and the anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 279 284.

- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C. (2005). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two endemic species from Turkey: Sideritis cilicica and Sideritis bilgerana. Chemistry of Natural Compounds, 41, 679 - 682.
- Janeska, B., Stefova, M. & Alipieva, K. (2007). Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. Acta Pharmaceutica, 57(3), 371-377.
- Kassi, E., Papoutsi, Z., Fokialakis, N., Messari, I., Mitakou, S. & Moutsatsou, P. (2004). Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6956-6961.
- Kilic, T., Yildiz, Y.K., Goren, A.C., Tumen, G. & Topcu, G. (2003). Phytochemical analysis of some *Sideritis* species of Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 39(5), 453-456.
- Kirimer, N., Baser, K.H.C., Demirci, B. & Duman, H. (2004). Essential oils of Sideritis species of Turkey belonging to the section Empedoclia. Chemistry of Natural Compounds, 40(1), 19-23.
- Kostadinova, E., Alipieva, K., Stefova, M., Antonova, D., Evstatieva, L., Stefkov, G., Tsvetkova, I., Naydesnki, H., Bankona, V. (2008). Influence of cultivation on the chemical composition and antimicrobial activity of *Sideritis* spp. *Pharmacognosy Magazine*, 4, 102 - 106.
- Koutsaviti, A., Bazos, I., Milenković, M., Pavlović-Drobac, M. & Tzakou, O. (2013). Antimicrobial activity and essential oil composition of five *Sideritis* taxa of Empedoclia and Hesiodia Sect. from Greece. *Records of Natural Products*, 7(1), 6-14.
- Kouvoutsakis, G., Mitsi, C., Tarantilis, P.A, Polissiou, M.G, Pappas, C.S. (2014). Geographical differentiation of dried lentil seed (*Lens culinaris*) samples using Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (DRIFTS) and discriminant analysis. *Food Chemistry*, 145, 1011–1014
- Küpeli, E., Şahin, P., Çaliş, I., Yeşilada, E., Ezer, N. (2007α). Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 356 - 360.
- Küpeli, E., Şahin, P., Yeşilada, E., Çaliş, I., Ezer, N. (2007β). In vivo antiinflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 62c, 519 – 525.

- Lehman, A., O'Rourke, N., Hatcher, L., Stepanski, E.J. (2005). *JMP[®] for Basic Univariate and Multivariate Statistics: A Step-by-Step Guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc., pp. 417-457.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., & Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer research*, 27(5A), 3293-3299.
- Loğoğlu, E., Arslan, S., Öktemer, A., & Şakıyan, İ. (2006). Biological activities of some natural compounds from *Sideritis sipylea* Boiss. *Phytotherapy Research*, 20(4), 294-297.
- Menghini, L., Massarelli, P., Bruni, G., Menghini, A. (2005). Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of *Sideritis syriaca* L. herbal extracts. *Journal of Medicinal Food*, 8, 227 – 231.
- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F., Hoult, R.S. (1988). Selectivity of neutrophil 5-lypoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 40,* 787 – 792.
- Navarro, A., de las Heras, B., Villar, A. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24*, 470 473.
- Ozkan, G. (2009). Comparison of antioxidant phenolics of ethanolic extracts and aqueous infusions from *Sideritis* species. *Asian Journal of Chemistry*, 21(2), 1024-1028.
- Özcan, M., Chalchat, J.C., & Akgül, A. (2001). Essential oil composition of Turkish mountain tea (*Sideritis* spp.). *Food Chemistry*, 75(4), 459-463.
- Özkan, G., Sagdiç, O., Özkan, M., Özçelik, H., Ünver, A. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of Turkish endemic *Sideritis* extracts. *Grasas y Aceites*, 56, 16 20.
- Papanikolaou, K. & Kokkini, S. (1982). A taxonomic revision of *Sideritis* L. section Empedoclia (Rafin.) Bentham (Labiatae) in Greece. In: Margaris, N., Koedam, A. & Vokou, D. (Eds.), *Aromatic Plants:Basic and Applied Aspects*, Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, 101-128.
- Pappas, C., Tarantilis, P.A., & Polissiou, M. (1998). Determination of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin in crude plant material using diffuse

reflectance infrared Fourier transform Spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 52(11), 1399-1402.

- Pappas, C., Tarantilis, P.A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., & Polissiou, M. (2002). Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus rodustrus* Sm.). Ultrasonics sonochemistry, 9(1), 19-23.
- Petreska Stanoeva, J. & Stefova, M. (2012). Evaluation of the ion trap MS performance for quantification of flavonoids and comparison to UV detection. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(11), 1395-1406.
- Petreska, J., Stefova, M., Ferreres, F., Moreno, D.A., Tomás-Barberán, F.A., Stefkov, G., ... & Gil-Izquierdo, A. (2011). Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal "Mountain Tea". *Food Chemistry*, 125(1), 13-20.
- Plioukas, M., Termentzi, A., Gabrieli, C., Zervou, M., Kefalas, P. & Kokkalou, E. (2010). Novel acylflavones from *Sideritis syriaca* ssp. syriaca. Food Chemistry, 123(4), 1136-1141.
- Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Janković, T., Zdunić, G., Ristić, M., Godjevac, D. & Konić-Ristić, A. (2011). Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. *Food Chemistry*, 124(1), 226-233.
- Rios, J.L., Máñez, S., Paya, M., Alcaraz, M.J. (1992). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 31, 1947 - 1950.
- Rodríguez-Linde, M.E., Díaz, R.M., García-Granados, A., Quevedo-Sarmiento, J., Moreno, E., Onorato, M.R., Parra, A., Ramos-Cormenzana, A. (1994). Antimicrobial activity of natural and semisynthetic diterpenoids from *Sideritis* spp. *Microbios*, 77, 7 - 13.
- Sagdic, O., Aksoy, A., Ozkan, G., Ekici, L., Albayrak, S. (2008). Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 80 84.
- Santana-Meridas, O., Polissiou, M., Izquierdo-Melero, M.E., Astraka, K., Tarantilis, P.A., Herraiz-Penalver, D., Sanchez-Vioque, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59, 125–134.

- Sarac, N., Ugur, A. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of Bio-Sciences*, 4, 28 – 37.
- SAS Institute Inc. (2010). *JMP*[®] 9 Modeling and Multivariate Methods. Cary, NC: SAS Institute Inc., pp. 439-482.
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13-25.
- Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H. & Özcan, M. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational spectroscopy*, 39(2), 249-256.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Table and Charts* (3rd ed.). West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Stanoeva, J. P., Bagashovska, D., & Stefova, M. (2012). Characterization of urinary bioactive phenolic metabolites excreted after consumption of a cup of mountain tea (*Sideritis scardica*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(2), 229-243.
- Strid, A. & Tan, K. (Eds) (1991). *Mountain flora of Greece*, *Vol.2*. Edinburgh: University Press.
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Tadić, V., Bojović, D., Arsić, I., Đorđević, S., Aksentijevic, K., Stamenić, M. & Janković, S. (2012). Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae extracts. *Molecules*, 17(3), 2683-2703.
- Tomás-Barberán, F.A. & Wollenweber, E. (1990). Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Plant Systematics and Evolution*, 173(3-4), 109-118.
- Topçu, G., Gören, A.C., Kılıç, T., Yıldız, Y.K. & Tümen, G. (2002). Diterpenes from Sideritis sipylea and S. dichotoma. Turkish Journal of Chemistry, 26(2), 189-194.
- Tsaknis, J. & Lalas, S. (2005). Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euboea* (mountain tea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6375-6381.

- Tunalier, Z., Kosar, M., Ozturk, N., Baser, K.H.C., Duman, H., Kirimer, N. (2004). Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. *Chemistry of Natural Compounds, 40*, 206 – 210.
- Uğur, A., Varol, O., Ceylan, O. (2005). Antibacterial activity of *Sideritis curvidens* and *Sideritis lanata* from Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 43, 47 52.
- Vasilopoulou, C.G., Kontogianni, V.G., Linardaki, Z.I., Iatrou, G., Lamari, F.N., Nerantzaki, A.A., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. & Margarity, M. (2013).
 Phytochemical composition of "mountain tea" from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 107-116.
- Venturella, P. & Bellino, A. (1977). Eubotriol and eubol, new diterpenes from *Sideritis euboea. Experientia*, *33(10)*, 1270-1271.
- Villar, A., Alcaraz, M.J. (1984). Effect of borjatriol on nystatin oedema. *Pharmazie*, 39, 278 279.
- Villar, A., Salom, R., Alcaraz, M.J. (1983). Effect of borjatriol on established adjuvant arthritis. *Pharmazie*, *38*, 566.
- Villar, A., Navarro, A., Zafra-Polo, M.C., Ríos, J.L. (1984α). Constituents of the essential oil of *Sideritis mugronensis*. *Plantes medicinales et phytotherapie*, 18, 150 153.
- Villar, A., Salom, R., Alcaraz, M.J. (1984β). An approach to the antiinflammatory activity of borjatriol. *Planta Medica*, 50, 90 92.
- Villar, A., Jimenez, M.J., Alcaraz, M.J. (1986α). The anti-inflammatory activity of the genus *Sideritis*: a new insight. *Plantes medicinales et phytotherapie*, 20, 31 – 36.
- Villar, A., Recio, M.C., Rios, J.L., Zafra-Polo, M.C. (1986β). Antimicrobial activity of essential oils from *Sideritis* species. *Pharmazie*, *41*, 298 299.
- Villena, C., Vivas, J.M., Villar, A.M. (2000). Suppression of croton oil-induced rabbit corneal edema by *Sideritis javalambrensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 301 - 305.
- Vivekanand, V., Chawade, A., Larsson, M., Larsson, A., & Olsson, O. (2014). Identification and qualitative characterization of high and low lignin lines from an oat TILLING population. *Industrial Crops and Products*, 59, 1-8.

Zarzuelo, A., Garcia, E., Jiménez, J., Ocete, M.A., Utrilla, P., Socorro, O. (1993). Antiinflammatory and anti-ulcerative activity of various species of the genus *Sideritis* from the Alpujarra region of Spain. *Fitoterapia*, 64, 26 – 30.

Παράρτημα



Γράφημα Π 1 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata A.



Γράφημα Π 2 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis perfoliata B.



Γράφημα Π 3 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis raeseri.



Γράφημα Π 4 Τυπικό αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του Sideritis scardica.



Γράφημα Π 5 Δομές των συστατικών των αιθερίων ελαίων των εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη.



Γράφημα Π 6 Δομές των συστατικών των αιθερίων ελαίων των εξεταζόμενων πληθυσμών σιδερίτη (συνέχεια).



Γράφημα Π 7 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata A (κόκκινο), S. perfoliata B (μπλε), S. raeseri (πράσινο) και S.scardica (μαύρο).



Γράφημα Π 8 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των Sideritis perfoliata A (κόκκινο), S. perfoliata B (μπλε), S. raeseri (πράσινο) και S.scardica (μαύρο) μετά την όξινη υδρόλυση.



Γράφημα Π 9 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των *Sideritis perfoliata* A πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο).



Γράφημα Π 10 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των *Sideritis perfoliata* Β πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο).



Γράφημα Π 11 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των Sideritis raeseri πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο).



Γράφημα Π 12 Συγκριτική εικόνα χρωματογραφημάτων LC των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των *Sideritis scardica* πριν (μαύρο) και μετά την όξινη υδρόλυση (κόκκινο).



Γράφημα Π 13 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του βερμπασκοζίτη.



Γράφημα Π 14 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του 7-Ο-[6^{'''}-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο $(1\rightarrow 2)$ γλυκοζίτη της ισοσκουτελαρεΐνης.



Γράφημα Π 15 Φάσμα UV και φάσμα μαζών του 7-Ο-[6"'-Ο-ακετυλο]-αλλοσυλο $(1\rightarrow 2)$ γλυκοζίτη της 4΄-Ο-μεθυλοϊσοσκουτελαρεΐνης.